

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium metabolismu karcinogenní a nefrotoxické přírodní látky
aristolochové kyseliny II**

**Study of metabolism carcinogenic and nephrotoxic natural compound
aristolochic acid II**

Diplomová práce

Bc. Lenka Martináková

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2019

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky paní prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité zdroje a literaturu jsem řádně citovala.

V Praze, dne

.....

Bc. Lenka Martináková

Ráda bych se v první řadě poděkovala paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za trpělivost, odbornou pomoc a usměrnění během spolupráce.

Další poděkování patří Dr. Jaroslavu Mrázovi a Ing. Šárce Duškové za analýzu metabolitů aristolochových kyselin v moči experimentálních potkaních modelů a zpracování výsledných dat.

Mé díky patří také kolektivu kolegů a kolegyně v laboratoři 219, za vytvoření přátelského prostředí během mého studia. V neposlední řadě mé díky patří rodině, která při mně stála během celého studia.

Předkládaná diplomová práce byla vypracována za podpory grantu GAČR 17-12816 S.

Abstrakt

Aristolochové kyseliny (AA) jsou považovány za rostlinné toxikanty, které se přirozeně nacházejí v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae*. Nejvíce zastoupenými kyselinami v uvedených rostlinách jsou aristolochová kyselina I (AAI) a aristolochová kyselina II (AAII). AA se považují za původce renálního onemocnění označovaného jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN). AAN byla zpočátku objevena u pacientů jedné bruselské kliniky v Belgii zaměřené na redukci tělesné hmotnosti. Prvotní název onemocnění byl nefropatie vyvolána čínskými bylinami (CHN). Později se zjistilo, že při léčbě omylem došlo k záměně jedné složky použitého bylinného přípravku s rostlinou čeledi *Aristolochiaceae*. Druhý typ renálního onemocnění vyvolaného AA se označuje jako Balkánská endemická nefropatie (BEN), která byla vyvolána v důsledku kontaminace obilí oblasti podél řeky Dunaje v balkánských zemích právě rostlinami obsahujícími AA. Tato renální onemocnění (AAN i BEN) se často spojují s pozdějším nástupem urotheliální rakoviny horních močových cest (UUC). AA (AAI a AAI) v organizmech podléhají biotransformaci vedoucí k jejich redukční aktivaci nebo oxidační detoxikaci. Na jejich redukci participují jak cytosolární enzymy [NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa], tak enzymy mikrosomální [cytochromy P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasa]. Finálním redukčním metabolitem obou kyselin je aristolaktam, avšak prekursor aristolaktamu se snadno rozpadá na aktivní nitréniový kation reagující s DNA za vzniku kovalentních aduktů. Zejména adukt AAI s DNA 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I (dA-AAI) je zodpovědný za transverzní mutaci AT \rightarrow TA, která je klíčová v tumor-supresorovém genu *p53*. Z dosavadních studií nebyly detekovány žádné oxidační metabolity AAI, a to ani v experimentech *in vitro* ani ve zvířecích modelech *in vivo*. Předkládaná diplomová práce je zaměřená na objasnění metabolismu AAI (redukční aktivaci a oxidační detoxikaci této kyseliny). K studiu metabolismu AAI byly využity experimentální přístupy *in vitro* i *in vivo*. Kromě toho byla také sledována tvorba aduktů AAI s DNA v obou uvedených experimentálních přístupech. Daná práce potvrzuje, že jedinou metabolickou dráhou AAI je redukční aktivace této kyseliny vedoucí ke vzniku finálního metabolitu, aristolaktamu I a vzniku specifických aduktů AAI s DNA.

Klíčová slova: *Aristolochiaceae*, aristolochové kyseliny, nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, nefropatie vyvolána čínskými bylinami, balkánská endemická nefropatie, urotheliální rakovina, aristolochová kyselina II

Abstract

Aristolochic acids (AA) have been considered as toxicants of plants which were found in plants of the family *Aristolochiaceae*. The most abundant acids in mentioned plants are aristolochic acid I (AAI) and aristolochic acid II (AAII). AA have been considered as causes kidney disease called Aristolochic acid nephropathy (AAN). AAN was initially discovered in patients of one Belgian clinic in Brussels specialized on treatment of patients leading to a decrease in their body weight. The first name of this disease was Chinese herb nephropathy (CHN). Later, it was discovered that one component of herbal preparation was changed by a mistake with the *Aristolochiaceae* plant. The second type of renal disease caused by AA was discovered in populations of countries along the Danube river, called as Balkan endemic nephropathy (BEN), which was probably caused by the contamination of grains with plants containing AA. These renal diseases (AAN and BEN) are often associated with development of upper urothelial cancer (UUC). AA (AAI + AAI) in organisms are subject to biotransformation leading to its reductive activation or oxidative detoxification. Both cytosolic enzymes [NAD(P)H:quinone oxidoreductase] and microsomal enzymes [cytochromes P450, NADPH:cytochrome P450 reductase] participate in their reduction. The final reducing metabolite of both aristolochic acids is aristolactam, however the precursor of aristolactam readily disintegrates in a reactive nitrenic cation reacting with DNA to form covalent adducts. Especially, the AAI-DNA adduct 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolactam I (dA-AAI), is responsible for the transversion mutation AT → TA, which is key in the tumor suppressor gene *p53*. From previous studies, no oxidative metabolites of AAI have been detected in either *in vitro* experiments or *in vivo* animal models. This diploma thesis is focused on explanation of metabolism of AAI (reductive activation and oxidative detoxification of this acid). For the study of AAI metabolism, the *in vitro* and *in vivo* experimental approaches were used. In addition, the formation of AAI-DNA adducts was also investigated using both approaches. The present thesis confirms that the only metabolic pathway of AAI is the reductive activation of this acid leading to the formation of its final metabolite, aristolactam I and the formation of the specific AAI-DNA adducts.

Key words: *Aristolochiaceae*, aristolochic acids, Aristolochic acid nephropathy, Chinese herb nephropathy, Balkan endemic nephropathy, urothelial cancer, aristolochic acid II

Obsah

Abstract	5
Seznam použitých zkratk	8
1 Rakovina – civilizační onemocnění	11
1.1 <i>Kancerogeneze</i>	14
1.2 <i>Faktory ovlivňující vznik rakoviny</i>	15
1.2.1 Chemické faktory způsobující nádorové procesy	15
1.2.2 Fyzikální faktory způsobující nádorové procesy	16
1.2.3 Biologické faktory způsobující nádorové procesy	17
1.3 <i>Geny podílející se na vzniku nádoru</i>	17
1.3.1 Onkogeny	18
1.3.2 Tumor-supresorové geny	21
2 Aristolochové kyseliny jako rostlinný toxikant	23
2.1 <i>Rostliny čeledi podražcovitých (Aristolochiaceae)</i>	23
2.2 <i>Aristolochové kyseliny – přírodní toxikanty</i>	26
2.2.1 Metabolismus aristolochových kyselin.....	27
2.2.1.1 <i>Redukční aktivace aristolochových kyselin v organizmech</i>	28
2.2.1.2 <i>Oxidační detoxikace aristolochových kyselin v organizmech</i>	31
2.2.2 Onemocnění vyvolaná aristolochovými kyselinami	32
2.2.2.1 <i>Balkánská endemická nefropatie</i>	32
2.2.2.2 <i>Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami</i>	35
3 Cíl diplomové práce	38
4 Materiál a metody	39
4.1 <i>Použitý materiál a chemikálie</i>	39
4.2 <i>Přístroje</i>	39

4.3	<i>Metody</i>	41
4.3.1	Izolace jaterní mikrosomální a cytosolární frakce z potkaních modelů.....	41
4.3.2	Redukce AAI reduktasami potkaních jaterních mikrosomů a cytosolů	42
4.3.2.1	<i>Analýza metabolismu AAI prostřednictvím vysokotlakové (vysokoučinné) kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)</i>	43
4.3.3	Oxidace AAI oxidoreduktasami potkaních jaterních mikrosomů	44
4.3.3.1	<i>Analýza metabolismu AAI prostřednictvím vysokotlakové (vysokoučinné) kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)</i>	45
4.3.4	Analýza AAI a jejich metabolitů v moči potkanů vystavených působení směsí AAI s AAI a samotnou AAI.....	45
4.3.5	Analýza aduktů DNA s AAI tvořených po redukční aktivaci tohoto toxikantu..	45
5	Výsledky	47
5.1	<i>Redukce AAI jaterním cytosolárním a mikrosomálním subcelulárním systémem potkanů</i>	47
5.2	<i>Oxidace AAI jaterním mikrosomálním subcelulárním systémem potkanů</i>	53
5.3	<i>Tvorba aduktů AAI s DNA v experimentech in vitro</i>	55
5.4	<i>Analýza metabolitů AAI v moči potkanů premedikovaných směsí AAI s AAI a samotnou AAI</i>	56
5.5	<i>Tvorba aduktů AAI a AAI s DNA v potkaních modelech in vivo</i>	60
6	Diskuze	62
7	Závěr	65
	Seznam použité literatury	66

Seznam použitých zkratek

AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia
Alac I	aristolaktam I
AlacIa	aristolaktam Ia
AAII	aristolochová kyselina II
AlacII	aristolaktam II
AAN	Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (z angl. „Aristolochic acid nephropathy“)
AMP	adenosinmonofosfát
AP-1	transkripční faktor
BEN	Balkánská endemická nefropatie (z angl. „Balkan endemic nephropathy“)
<i>BCL2</i>	proto-onkogen
<i>c-erbB</i>	lidský onkogen
<i>c-fos</i>	lidský onkogen
<i>c-jun</i>	lidský onkogen
<i>c-myc</i>	lidský onkogen
<i>c-sis</i>	lidský onkogen
CD ⁴⁺	pomocné T-lymfocyty
CYP	cytochromy P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin- <i>N</i> ⁶ -yl)aristolaktam I

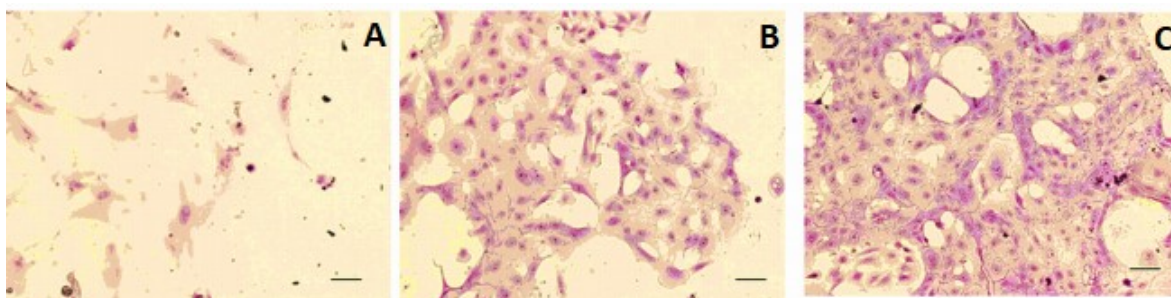
dA-AAII	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II
dG-AAI	7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I
dG-AAII	7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam II
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. „epidermal growth factor receptor“)
GF	růstové faktory (z angl. „growth factors“)
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (z angl. „G protein-coupled receptor“)
HPLC-MS	HPLC s hmotnostní spektrometrií
<i>H-ras</i>	myší a potkaní onkogen
CHN	Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (z angl. „Chinese herbs nephropathy“)
LOH	z angl. „loss of heterozygosity“
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NADPH-GS	NADPH generující systém
NK	z angl. „natural killers“
NQO1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa
OTA	ochratoxin A
<i>p53</i>	tumor-supresorový gen
p53	onkogenní protein kódovaný genem <i>p53</i>
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček (z angl. „platelet-derived growth factor“)
POR	NADPH:CYP reduktasa
<i>raf</i>	onkogen

<i>ras</i>	onkogen
Ras	onkogenní protein kódovaný genem <i>ras</i>
Rb	retinoblastomový protein kódovaný genem <i>rb</i>
RP-HPLC	vysokotlaková (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie s reverzní fází
RPM	počet otáček za minutu
SV40	opičí virus 40 (z angl. „simian virus“)
TEAA	triethylaminacetát
Treg	regulační T-lymfocyty
Tris	1,1,1-tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSGs	tumor-supresorové geny (z angl. „tumor supressor genes“)
UUC	Urotheliální rakovina horních močových cest (z angl. „upper urothelial cancer“)
UV	ultrafialové záření
<i>v-erbB</i>	virový onkogen
<i>v-sis</i>	virový onkogen
<i>v-src</i>	virový onkogen

1 Rakovina – civilizační onemocnění

Pojem **rakovina** popisuje proces abnormálního růstu buněk způsobeného vícenásobnými změnami v genové expresi vedoucí k nekontrolovatelné buněčné proliferaci. V konečném důsledku daný proces může vést ke vzniku populace buněk kolonizujících okolní tkáň, které mohou metastazovat do jiných oblastí těla¹.

Pokud dojde k poškození zdravé tkáně, ihned dochází k aktivaci odpovědi normálním kontrolním mechanismem. Reservní nebo kmenové buňky jsou schopné proliferace a diferenciaci a díky tomu jsou schopné následně nahradit poškozené buňky. Na rozdíl od toho, nádorové buňky (ačkoli je nelze přesně definovat) se od zdravých buněk liší abnormální proliferací, což poukazuje na nedostatečnou odpověď kontrolního mechanismu. Avšak nádorové buňky se po své transformaci nemusí hned dělit a vzhledem k dané skutečnosti je potřebné nádory rozlišovat na *benigní a maligní*². **Benigní nádor** je charakteristický expanzním růstem, obvykle je zapouzdřen, čímž se odděluje od normální tkáně, a tím neinvaduje okolní tkáň. I když benigní nádor není schopen tvořit metastázy, může svým růstem potlačovat normální okolní tkáň, což může být životu nebezpečné (např. tlak na nervy nebo cévy). Rovněž může sekretovat hormony, čímž ovlivní mechanismy udržující homeostázu¹⁻³. Naopak **maligní nádor** napadá a ničí okolní tkáň. Šíří se pomocí lymfatického a krevního systému a vytváří sekundární ložiska (metastázy). Maligní nádorové buňky mají tendenci být anaplastické, dediferencované ve srovnání zdravými buňkami tkáně, ve které se nacházejí. Mají také nepravidelný tvar a velikost, zvýšenou mitotickou aktivitu a přítomnost abnormálních chromozomů¹⁻³.

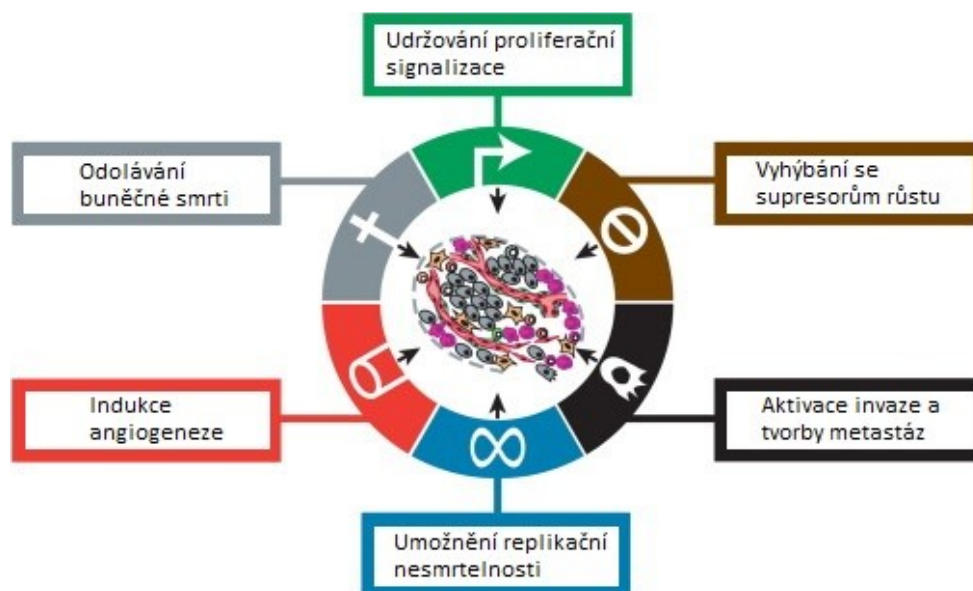


Obr. 1: Reprezentativní mikroskopické fotografie buněk lidské příušní slinné žlázy. Fotografie jeden týden kultivovaných normálních (A), benigních (B) a maligních (C) buněk. Buňky byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Snímky byly pořízeny při 10x zvětšení (pruhy = 0,2 mm) pomocí mikroskopu Olympus 51BX (převzato a upraveno z⁴).

Jak bylo výše uvedeno, jeden z nejdůležitějších rozdílů mezi benigním a maligním nádorem je schopnost tvořit metastázy. Nádorové buňky v průběhu tvorby metastáz podléhají hlavním krokům: *invaze*, *intravazace*, *transport*, *extravazace* a *kolonizace*. Nádorové buňky se musí nejprve oddělit od ostatních a překonat bazální membránu (**invaze**). Následně musí vstoupit do krevního nebo lymfatického oběhu (**intravazace**). Přeprava nádorových buněk v krevním oběhu je „jednosměrná“ a buňky buď cestují samostatně nebo ve shluku s krevními destičkami nazývanými emboly (**transport**). Dále musí nádorové buňky „uniknout“ z krevní nebo lymfatické cévy, aby se mohly šířit (**extravazace**). Daný proces je podobný intravazaci, jen opačný. Posledním krokem je **kolonizace** představující progresivní růst nádoru (tzv. sekundárního) ve vzdáleném místě a zahrnuje proces angiogeneze. Nicméně mohou existovat „spící“ metastazující nádorové buňky. Takový shluk buněk se nazývá mikrometastázy, které pravděpodobně udržují celkovou rovnováhu mezi proliferací buněk a jejich apoptózou³. Schopnost tvorby metastáz je regulována, resp. ve většině případů limitovaná okolním mikroprostředím^{5,6}. To je tvořeno zdravými stromálními buňkami, rozpustnými faktory, živinami, sítí cév a extracelulární matrix⁷. Z vnitřně limitujících faktorů je to schopnost nádorové buňky se oddělit od primární léze a nepodlehnout apoptóze. Nádorová buňka musí být schopna interakce s extracelulární matrix a potenciálně ji remodelovat. Navíc musí být dostatečně pohyblivá, aby dosáhla kapilární cévy a mohla se dále šířit. Na regulaci tvorby metastáz vnějšími mechanismy se podílí metabolické, stromální a imunologické mikroprostředí. Z metabolického hlediska je nádorová tkáň hypoxická, což může vést k umlčení tumor-supresorových genů. Kromě toho jsou nádorové buňky schopny různými způsoby ovlivnit složení stromy tak, aby podporovala tvorbu metastáz. Schopnost tvorby metastáz mohou také podporovat i určité populace imunitních buněk (např. Treg, CD⁴⁺), které mohou vytvářet imunosupresivní prostředí⁸. Je to překvapující poznatek, protože hlavní funkcí imunitního systému savců je sledování a udržování homeostázy tkání a zároveň jejich ochrana a eliminace patogenů nebo poškozených buněk⁹. Kromě toho bylo prokázáno, že zánět ovlivňuje všechna stadia vývoje nádoru (např. podporuje rakovinu prsu, karcinom žaludku). Zánět je vyvolán řadou imunitních buněk včetně makrofágů, neutrofilů, dendritických buněk, buněk přirozených zabíječů (NK) a lymfocytů T a B^{10,9}.

Předchozí uvedené poznatky můžeme shrnout na šest charakteristických biologických znaků rakoviny. Dané znaky se získávají během vícestupňového vývoje lidského nádoru a představují „racionální“ princip komplexnosti tohoto neoplastického

onemocnění. Zmíněné charakteristické znaky jsou uvedeny na **Obr. 2**. Zahrnují udržování signalizace proliferace buňky, vyhýbání se supresorům růstu, odolávání buněčné smrti, umožnění replikační nesmrtelnosti, indukce angiogeneze (procesem tvorby nových krevních cév ze stávajících cévních struktur¹¹) a aktivace invaze a tvorby metastáz¹².



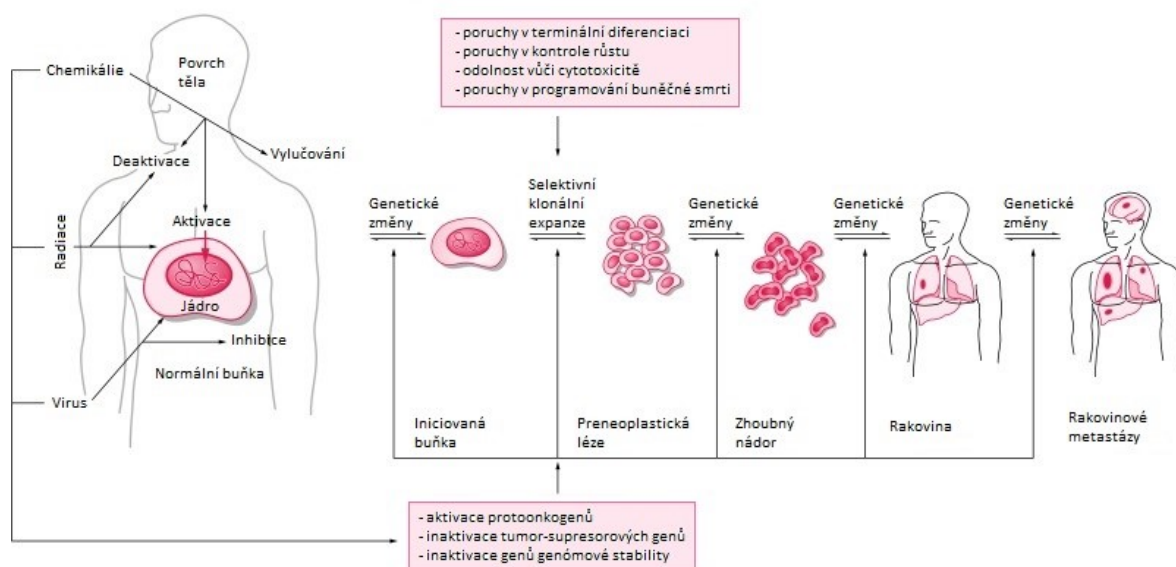
Obr. 2: Charakteristické znaky rakoviny (převzato a upraveno z ¹²).

Jednotlivé názvy lidských nádorů nebo rakoviny jako celku jsou odvozeny od buněk v nichž došlo k transformaci. Nejčastěji vyskytující se rakovina je odvozena od epitelálních buněk a klasifikuje se jako **karcinom**. **Sarkomy** jsou nádory odvozené od mezenchymálních buněk a **adenokarcinomy** jsou nádory sekreční sliznice^{1,3}. Kromě zmíněných "pevných" nádorů se klasifikují i "kapalné" nádory s pohyblivými prekursorovými buňkami. Mezi ně se řadí nádor pocházející z krvevorných tkání (kostní dřeň) označující se jako **leukémie** a **lymfóm**, vznikající z buněk imunitního systému¹³. Z nejčastějších benigních nádorů nervového systému jsou to nádory periferních nervů dělených do dvou skupin: *schwannomy* a *neurofibrómy*. **Schwannómy** jsou zapouzdřené nádory vznikající z periferních nervů obsahujících množství proliferujících Schwannových buněk. Naopak **neurofibrómy** obsahují různé složky malých periferních nervů včetně Schwannových buněk a vznikají z endoneúria (vrstva pojivové tkáně kolem každého vlákna periferního nervu). Nádory zárodečných buněk (kmenové buňky) se nazývají **teratomy** a mohou obsahovat zcela zralé ale i nediferencované buňky².

1.1 Kancerogeneze

Proces vývoje rakoviny tzv. **kancerogeneze** může být výsledkem působení jakýchkoli chemických, biologických, fyzikálních faktorů a jejich kombinací. Z genetického hlediska jsou důležité kritické molekulární cíle během jednotlivých fází kancerogeneze². V průběhu kancerogeneze dochází k aktivaci proto-onkogenů a inaktivaci tumor-supresorových genů. Většina kontrolních mechanismů v buňce zahrnuje oba zmíněné procesy¹³.

Kancerogeneze má vícestupňový průběh, ale rozděluje se minimálně do čtyř stádií: *iniciace*, *propagace*, *maligní konverze* a *progrese*. První stádium, **iniciace**, je vyvoláno irreverzibilní změnou v genetické informaci. Nejpravděpodobněji jednou nebo více genetickými mutacemi, transverzí nebo malými delecemi v DNA. Druhé stádium, **propagace**, nezahrnuje reverzibilní změny ve struktuře DNA, ale spíše změny v expresi genomu na základě interakce promotor-receptor. Zahrnuje selektivní klonální expresi iniciovaných buněk. Ačkoli toto stádium není karcinogenní, protože indukce tvorby nádoru je příslušná dávce iniciátoru, jehož množství je nedostatečné, propagace přispívá k procesu karcinogeneze. Se zvyšující se klonální expresí úměrnou rychlosti buněčného cyklu roste riziko akumulace mutací, a tím i riziko maligní konverze (**Obr. 3**)^{2,14,15}.



Obr. 3: Schématické znázornění vývoje rakoviny a faktory podílející se na její vzniku (převzato a upraveno z ¹⁵).

Třetí stádium, **maligní konverze**, je charakteristická transformací preneoplastické buňky na buňku maligního fenotypu. Daná transformace vyžaduje další genetické změny, které mohou být částečně způsobeny nepřesnostmi v syntéze DNA. Čtvrté stadium, **progrese**, konečná fáze je charakterizována nestabilitou karyotypu a maligním růstem. Metastázy mohou zahrnovat produkci proteáz nádorovými buňkami, a tím invazi místa mimo primárního nádoru (**Obr. 3**). V průběhu může dojít k dalším genetickým a epigenetickým změnám včetně aktivace proto-onkogenů nebo ztrátě funkce tumor-supresorových genů^{2,14,15}.

1.2 Faktory ovlivňující vznik rakoviny

Vznik rakoviny a její následný růst může mít v některých případech předvídatelně vlastnosti. Míra výskytu různých druhů rakovin je ovlivněna faktory životního prostředí a životního stylu jedince¹. Tedy na vzniku rakoviny se podílejí vnější faktory, ať už jsou biologického, chemického nebo fyzikálního původu (**Obr. 3**)². Standardní koncept transformace normální buňky na nádorovou je založen na působení chemických karcinogenů, onkogenních virů, poškození z ozáření nebo endogenních poškození způsobených oxidačním působením na DNA a mnoho dalších způsobů¹. Kromě toho se spekuluje, že různé varianty genů jsou spojovány s rozličnými odpověďmi na živiny známými jako interakce gen-strava a tyto variace mohou být spojovány s rozdílnými riziky vzniku rakoviny¹⁶. Nedávno bylo publikováno, že mikrobiální nerovnováha může hrát klíčovou roli ve vývoji mnoha onemocnění, jako je rakovina, autoimunitní stavy a zvýšená náchylnost k infekci. Mikrobiální účinek na nádor může být lokální nebo systematický prostřednictvím fyziologické komunikace mezi organizmem a mikrobiální flórou¹⁷.

1.2.1 Chemické faktory způsobující nádorové procesy

Ve zdravých buňkách je požadavek nebo odpověď na poškození opravnými mechanismy jasná. V případě nedostatečné až žádné odpovědi takového mechanismu je obtížné zjistit životnost člověka při denním vystavení enviromentálních karcinogenů bez nepříznivého toxického vlivu nebo nezbytné výšky míry rakoviny. Jedním z následků alternativního opravného mechanismu může být i vznik rakoviny².

Po vystavení se chemickým karcinogenům dochází k jejich metabolické aktivaci. K aktivaci zjevně dochází vznikem kovalentní vazby mezi elektrofilní formou karcinogenu

s nukleofilním místem v proteinech nebo nukleových kyselin. Interakce mezi chemickým karcinogenem a DNA indukuje dědičnou změnu v buňce vedoucí k její maligní transformaci. Tvorba příslušných aduktů DNA s chemickými karcinogeny má následně biologické následky. Právě onkogeny a tumor-supresorové geny, které jsou podrobněji rozebírány v **kap. 1.3**, jsou pro vyvolání tvorby nádorů hlavními cíli chemických karcinogenů¹. Mezi environmentální chemické karcinogeny patří aromatické aminy, nitrosaminy, ionty kovů (např. arzén, beryllium, olovo, rtuť), cigaretový kouř, přírodní vlákna nebo prach (např. azbest, silice), pesticidy, vedlejší produkty petrochemického průmyslu, reaktivní chemikálie (např. formaldehyd, butadien) a různé rozpouštědla (např. benzen, toluen)¹⁸. Existuje stále více důkazů naznačujících, že vystavení populace benzenu, pesticidum a minerálním vláknům na pracovišti může být spojeno se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny¹⁹.

1.2.2 Fyzikální faktory způsobující nádorové procesy

Podobně jako chemické, i fyzikální karcinogeny mohou působit na DNA, a tím pádem mít mutagenní účinky. Jejich působení indukuje vznik jednovláknových nebo dvouvláknových zlomů v DNA, bodových mutací a chromozomálních translokací. UV záření způsobuje vznik pyrimidinových dimerů. Dané poškození následně indukuje opravné mechanismy¹. Kromě toho, poškození způsobené ozářením vede k tvorbě volných radikálů, přičemž jejich množství závisí na intenzitě radiační energie¹. Radiace indukující tyto stresové signály v normálních savčích buňkách také aktivují opravné dráhy poškození DNA a kontrolní body buněčného cyklu, což má za následek zotavení nebo smrt buněk²⁰.

Ozáření může způsobit rakovinné bujení téměř v každé tkáni nebo orgánu v těle, avšak nejvíc citlivé jsou kostní dřeň, prsa a štítná žláza. Většina současných nálezů potvrzuje, že všechny typy ozáření (ionizující i neionizující) mohou způsobovat rakovinu². Také na základě současných narůstajících důkazů i specifické neionizující záření může být rizikovým faktorem způsobujícím letální mutace¹⁹. U pracovníků pracujících v exteriéru, kteří jsou vystaveni UV ze slunečního záření může dojít k rozvoji vzniku rakoviny kůže²¹. Některé studie poukazují také na zvýšené riziko rakoviny mozku u osob vystavených neionizujícímu záření, zejména radiofrekvenčním polím vysílaným mobilními telefony¹⁸. Z ionizačního záření způsobující rakovinu je to zejména záření radonu vedoucí k vývoji

rakoviny plic po vystavení². Zjištěny byly také škodlivé účinky rentgenového záření (X-ray), a to ihned po jeho objevení vědcem W. K. Röntgenem¹.

1.2.3 Biologické faktory způsobující nádorové procesy

Již dlouho existuje podezření, že různé formy rakoviny, zejména některé lymfomy a leukémie, mohou být způsobeny přenosnými viry. Virová infekce může být zprostředkována přímo nebo nepřímo. Přímo cestou se myslí, že virové geny mohou samy způsobit transformaci buněk. Naopak nepřímá cesta představuje, že virová infekce může způsobit progresi růstu maligních buněk vytvořením imunodeficientního stavu¹. Mnoho nádorových onemocnění je spojována s lidským *papillomavirem*, hlavním původcem vzniku rakoviny děložního čípku². Mezi onkogenní viry patří také *herpesviry* (např. virus Epstein-Barrové), *viry hepatitidy B a C*. Asi polovina světové populace je infikována bakterií *Helicobacter pylori*, která kolonizuje žaludeční sliznici. Doposud je považována za jediný bakteriální druh spojovaný s předpokladem, že se jedná o možný lidský karcinogen^{17,2}.

1.3 *Geny podílející se na vzniku nádoru*

Vznik a rozvoj rakoviny je regulován pozitivními i negativními molekulárními faktory. Proto je pro růst nádoru třeba zvýšit aktivitu pozitivních faktorů, a naopak je třeba se zbavit těch negativních. Dosud je známo několik typů genů, které přispívají k rozvoji rakoviny, pokud dojde k jejich aktivaci. Takové geny se nazývají **onkogeny**. Mnoho buněčných genů lze považovat za onkogeny v případě jejich nevhodné exprese. Dané geny hrají dominantní roli na buněčné úrovni, řídí proliferaci buňky nebo brání její normální diferenciaci. Díky dané skutečnosti se onkogeny stávají potenciálním cílem pro léčbu speciálních typů rakoviny. Na druhé straně existují geny poskytující negativní regulační signály a také mohou přispívat k rozvoji rakoviny. Tyto geny se nazývají **tumor-supresorové geny** a jsou to geny, které kódují proteiny hrající důležitou roli v inhibici růstu a ve tvorbě nádoru. Aby mohly přispívat k vývinu rakoviny, musí dojít ke ztrátě jejich funkce^{2,3}. Mutace v případě onkogenů jsou mutace typu tzv. „získané funkce“ (z angl. „gain-of-function“) s dominantním fenotypem. Naopak mutace v případě tumor-supresorových genů jsou typu tzv. „ztráty funkce“ (z angl. „loss-of-function“) s recesivním fenotypem a aby se toto fenotypově mohlo projevit, musí dojít k inaktivaci obou alel¹. Mutace v těchto

zmíněných kritických genech se nacházejí ve všech typech rakovin a nádorové buňce dodávají selektivní výhodu. Proto je znalost těchto mutací klíčová pro pochopení vzniku rakoviny, její progresi a pro rozvoj cílených terapeutických strategií²². V současné době je většina cílených léčiv zaměřená na inhibitory onkogenů, protože inaktivace tumor-supresorových genů léčivý je těžko dokazatelná. Avšak v posledních letech se objevilo pár slibných strategií zaměřených na tyto geny nebo jimi řízenými drahami²³.

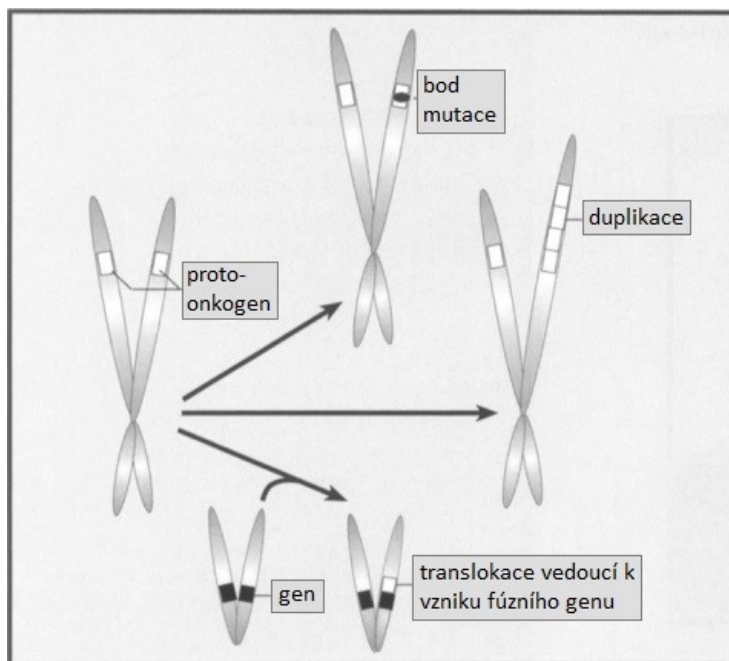
1.3.1 Onkogeny

Onkogeny (z řeckého slova *onkos* = nádor, gen způsobující rakovinu) se považují za aktivní verze „normálních“ genů nebo proto-onkogenů¹³. Za původní zdroj onkogenů se považují retroviry ve spojitosti s objevením mechanismu enzymu reverzní transkriptázy. Objev retrovirových onkogenů podnítil éru pokroku, která vyvrcholila novým pohledem na vznik rakoviny jako genetického onemocnění^{24,25}. Přesto, že viry v běžných lidských rakovinách nemají význam, jsou příčinou vzniku rakoviny u některých druhů zvířat^{2,3,13}. Klíčové vlastnosti všech retrovirových onkogenů byly poprvé identifikovány na onkogenu viru Rousova sarkomu, *v-src*^{25,3}.

Onkogeny představují klíčové hráče v růstu nádoru. Nedávné studie poukazují na jejich přímou regulaci kritických metabolických enzymů a metabolických signálních drah²⁶. Kromě úlohy v buněčném dělení a růstu hrají také klíčovou roli při ztrátě diferenciaci buňky, její pohyblivosti a ztrátě schopnosti podléhat apoptóze. Ve zdravých buňkách proto-onkogeny podléhají přísné regulaci, čímž se zabrání možné nadměrné proliferaci, resp. v případě poškození DNA bude buňka eliminována a nebude dále žít. Tedy onkogeny se od „normálních“ genů liší tím, že i když dojde k mutaci v onkogenu, buňka je schopná dále žít a nepodlehne apoptóze¹³. Navíc ztráta apoptózy nebo nekontrolovatelná proliferace mohou vést k mutaci způsobující inaktivaci obou kopií tumor-supresorových genů, kterým se budeme věnovat v následující **kap. 1.3.2**^{3,13}.

K aktivaci proto-onkogenů na onkogeny působením karcinogenů může dojít různými způsoby. Typické mutace asociované s aktivací proto-onkogenů jsou uvedeny na **Obr. 4**. Dané onkogenní mutace mohou obecně měnit regulaci kódovaného proteinu nebo měnit úroveň jeho exprese. Samotně aktivovaný onkogen není schopen přeměnit buňku na neoplastickou, ale musí dojít k sérii mutací v řadě různých genů. Buňka obsahující jednu nebo dvě mutace v určitých důležitých genech může mít tendenci se vyvíjet do tzv. polypů

nebo benigních nádorů. Chromozomální translokace, podobně i inzerce genů, způsobují vzájemné srovnání sekvencí, které se normálně vedle sebe nenacházejí a následně často dané konfigurace vedou k alternativní expresi genů^{1-3,13,27}.



Obr. 4: Typické mutace vedoucí k aktivaci proto-onkogenů na onkogen (str. 18, převzato a upraveno z²⁷).

Na základě biochemických a funkčních vlastností onkoproteinů se onkogeny klasifikují do pěti skupin¹³:

1. růstové faktory
2. receptory růstových faktorů
3. signální převodníky
4. transkripční faktory
5. regulátory buněčné smrti

Jako **růstové faktory** (z angl. „growth factors“, GF) jsou obvykle považovány látky stimulující proliferaci buňky a také látky podporující diferenciaci buňky ve speciálně cílové buňky. V současnosti jsou růstové faktory stanoveny jako důležité regulační látky v embryonálním růstu, vývoji, buněčné proliferaci a diferenciaci a proliferaci nádorových buněk¹. Přesto, že se většina růstových faktorů nepovažuje za onkogeny, jejich nadměrná

produkce může hrát významnou podporující roli v růstu nádoru¹³. Gen *v-sis* byl prvním virovým onkogenem kódujícím růstový faktor. *V-sis* je onkogen integrovaný do genomu viru opičího sarkomu. Později byl identifikován jako homologní gen s buněčným genem *c-sis*, který kóduje růstový faktor odvozený z krevních destiček (z angl. „platelet-derived growth factor“, PDGF). Daný faktor stimuluje proliferaci epitelových buněk v okolí ran^{3,13}.

Ligandy GF se vážou na **membránové receptory růstových faktorů** z vnější strany buněčné membrány. Následně se generuje signál na vnitřní straně membrány, který je pomocí signální transdukční dráhy přenášen do jádra¹³. První dobře definovanou signální transdukční dráhou byl proteinkinasový systém závislý na cyklickém AMP. Daný systém byl prvním tzv. receptorem spáženým s G proteinem (z angl. „G protein-coupled receptor“, GPCR)¹. Příklad receptoru GF je onkogen *v-erbB*, kterého původ byl identifikován z viru určitého typu ptačí leukémie. Daný virový onkogen je homologní s buněčným genem *c-erbB*. Gen *erbB* všeobecně kóduje receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. „epidermal growth factor receptor, EGFR), ale virová forma tohoto onkogenu má deletovanou extracelulární doménu³.

Mezi první a nejlépe popsateľné **signální dráhy** způsobující rakovinu patří RAS-RAF-MAP-kinázová dráha¹³. Jedním z nejznámějších příkladů aktivace onkogenů zejména chemickými a fyzikálními karcinogeny je *ras* proto-onkogen¹. Onkogenní mutace v *ras* genech jsou přítomny ve většině různých nádorů, z toho více než 90 % karcinomů pankreatu, 50 % karcinomů tlustého střeva, 30 % karcinomů plic a přibližně 20 % melanomů²⁶. Většina mutací v *ras* onkogenu se nachází v kodonech 12, 13 a 61. Mutace v daných kodonech vede ke ztrátě GTPázové aktivity proteinu, která je potřebná při návratu *ras*-proteinu do jeho neaktivní formy³. Aktivace *raf*-proto-onkogenu je běžná zejména u melanomů. Daný onkogen je prvním členem v signální kaskádě modulované třemi kinázami vedoucími k aktivované proteinkináze (MAPKKK → MAPKK → MAPK)¹³.

Z **transkripčních faktorů** je známý AP-1, jehož složky jsou kódovány proto-onkogeny *c-jun* a *c-fos*. Tento faktor je důležitý v regulaci růstu buňky, její diferenciaci a smrti. Nejčastěji pozorovaná onkogenní aktivace je v genu *c-myc*³. Původ daného genu byl identifikován v jednom ptačím viru. Příslušný transkripční faktor hraje klíčovou roli ve známém rakovinovém onemocnění, Burkittův lymfom, jako důsledek chromozomální translokace¹³. Proteiny kódované onkogeny *c-myc* představují transkripční faktory vážící se na sekvenci zesilovače tzv. E-box (z angl. „enhancer“) v promotorové oblasti genu. Jejich navázáním mohou regulovat transkripci, a tím pádem kontrolovat různé aspekty buněčné

transformace a růstu nádoru²⁸.

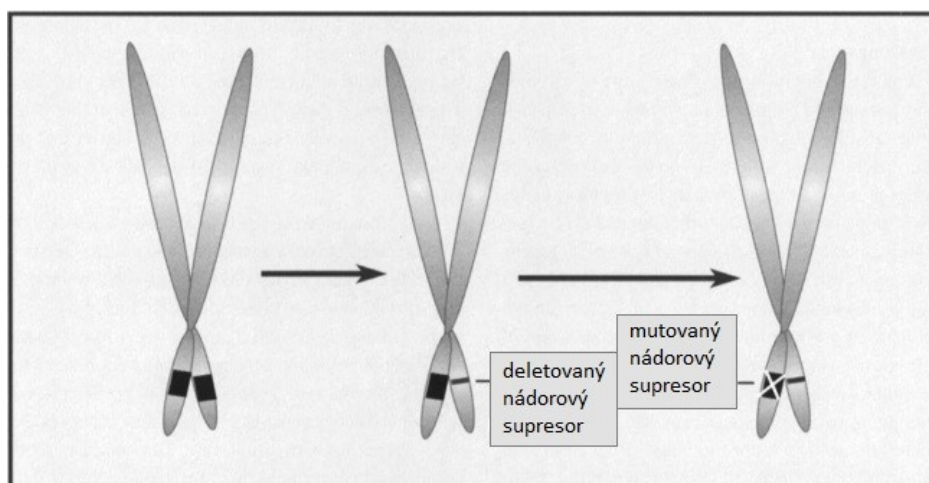
Ve zdravých tkáních je udržována rovnováha mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí tzv. apoptózou (programovaná buněčná smrt) pomocí **regulátorů buněčné smrti**. Studie rakovinových buněk poukázaly na skutečnost, že pokud dojde k nekontrolované proliferaci buňky nebo neschopnosti podlehnout apoptóze, může to přispívat ke vzniku nádoru a zároveň k intoleranci vůči protinádorovým lékům. Speciální regulace programované buněčné smrti je zajištěna jedinými proto-onkogeny rodiny *BCL2*¹³.

1.3.2 Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny (z angl. „tumor suppressor genes“, TSGs) jsou „ochránci“ buněk před jakýmkoliv poškozením DNA nebo nevhodným nadbytkem proliferčních signálů. Z jejich názvu je zřejmé, že brání přeměně buňky na maligní zastavením proliferace nebo navozením její apoptózy. Příslušné proteiny monitorují klíčové kontrolní body a v případě jejich absence nebo mutace v TSGs, vše může vést k onkogenezi^{2,13}. Tyto geny se také mohou obecně nazývat tzv. „střežícími“ geny (z angl. „gatekeeper genes“), a to proto, že kontrolují nebo inhibují růst buňky^{2,27}.

TSGs podléhají různým mutacím, avšak mutace typu „ztráty funkce“, která se právě vyskytuje u tohoto typu genů, jak již bylo v úvodu zmíněno, je v přírodě recesivní. Vzhledem k tomu musí být obě alely téhož genu mutované, pak se buňka může přeměnit na nádorovou^{29,30}. Základní proces inaktivace TSGs je zobrazen na **Obr. 5**. Takový proces vede ke stavu, tzv. z angl. „loss of heterozygosity“ (**LOH**) a dochází k nekontrolovanému růstu buněk, který je asociovaný se vznikem nádorů^{2,27}. Právě myšlenka inaktivace TSGs je známá jako tzv. hypotéza „dvou úderů“ a poprvé byla vyslovena genetikem Alfredem Knudsnem v roce 1971. Svou hypotézu vypracoval z hlediska poznání základních genetických mechanismů genu kódujícího retinoblastomový protein (**Rb**), kterého mutovaná forma je zodpovědná za vznik dětské formy rakoviny sítnice oka^{29,30}. Představuje 3 % ze všech typů rakovin v dětství a zároveň je nejběžnější formou maligního očního nádoru v dětství³¹. Tím, že ke stavu LOH může dojít různými způsoby, rozlišujeme dvě formy retinoblastomu. Familiární forma (40 %) je dědičná, kdy se jedna mutovaná alela dědí, tedy je přítomna ve všech buňkách a druhá mutace v alele je často výsledkem somatické rekombinace během mitózy. Naopak druhá forma retinoblastomu je sporadická (60 %), kdy

obě alely jsou výsledkem somatické mutace ve stejném retinoblastě³. Protein Rb hraje klíčovou roli v regulaci replikace buňky prostřednictvím vazby na určité transkripční faktory a proteiny zajišťující remodelaci chromatinu³².



Obr. 5: Ztráta funkce tumor-supresorového genu (str. 21, převzato a upraveno z ²⁷).

Kromě výše zmíněných „střežících“ genů, hrají TSGs také určitou roli jako tzv. „správcovské“ geny (z angl. „caretaker genes“). Tyto geny jsou zodpovědné za udržování "zdravého" stavu jiných genů, tzn. že potlačují vzniklé mutace. Dobrým příkladem takového genu se správcovskou schopností je gen kódující protein **p53**. Mutovaná forma příslušného genu je přítomná ve více než 50 % všech lidských nádorů²⁷. Původně se p53 považoval za onkogenní protein a poprvé byl detekován v komplexu s antigenem SV40 v transformovaných buňkách virem SV40¹. Protein p53 je schopen působit jako transkripční faktor a indukovat expresi velkého množství různých proteinů. Jeho primární funkcí je zastavit proliferaci buňky přerušením buněčného cyklu nebo navozením apoptózy, a proto vzhledem k dané skutečnosti jeho exprese a aktivita musí být přísně regulována². Funkce p53 mohou být ovlivněny řadou faktorů včetně typu buněk, mikroprostředím a mutacemi (tzv. onkogenními příhodami) získanými během vývoje nádoru. Z toho vyplývá, že ačkoli exprese různých genů v rámci propojení s p53 může být v nádorech změněna, kritické body se liší v závislosti na druhu buňky³³. Skutečné „správcovské“ geny jsou však obecně častěji zapojeny do oprav DNA, a tím vytvářejí vyšší úroveň mutací ve srovnání s mutacemi spojenými s p53. Nejlépe studovanými geny jsou právě geny *mlh1* a *mlh2* zapojené do „mismatch-oprav“ chybně začleněných bází během replikace DNA²⁷.

2 Aristolochové kyseliny jako rostlinný toxikant

Aristolochové kyseliny (AA) představují substituované nitrofenantrénové karboxylové kyseliny³⁴. V přírodě se nacházejí v rostlinách rodu *Aristolochia*, čeleď *Aristolochiaceae* (podražcovité³⁵). Různé druhy rostlin *Aristolochia* byly používány v tradiční medicíně, avšak jejich užívání bylo zakázáno, protože byl u nich prokázán nefrotoxický, karcinogenní a mutagenní účinek na lidský organizmus³⁴. Karcinogenní účinek AA je spojen s nitroredukcí jejich funkční skupiny za vzniku derivátu, aristolaktam-nitréniového iontu s delokalizovaným pozitivním nábojem, který je považován za ultimativní karcinogen^{15,36,37}.

2.1 Rostliny čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*)

Rostliny rodu *Aristolochia*, čeledi *Aristolochiaceae* jsou převážně tropickým až subtropickým druhem rostlin, který se vyskytuje ve středomořském a teplém pásmu na celém světě. V současnosti dosahuje tato čeleď bohatou různorodost³⁸. Čeleď *Aristolochiaceae* obsahuje přibližně přes 600 druhů³⁹. Od počátku 19. století existuje několik taxonomických členění této čeledi. Mezi nejznámější patří členění navržené Klotzschem (1859) a Duchartrem (1864), kteří rozdělili čeleď do 10 a 12 rodů⁴⁰. Přesto se klasifikace těchto rostlin zaměřuje hlavně pouze na čtyři hlavní linie: *Aristolochia*, *Asarum*, *Sarum* a *Thottea*³⁹. Právě rod *Aristolochia* je největším a nejrozmanitějším rodem rostoucím v mírných až tropických oblastech na celém světě⁴¹. Většina druhů této čeledi jsou popínavými rostlinami (révy nebo liány), přibližně až 500 druhů. Avšak některé druhy rostou i jako trvalé byliny a část z nich roste i ve formě keřů nebo malých stromků^{42,40}. Jejich růst jako keře je velmi vzácný a vyskytuje se v podrodu *Isotrema* ve Střední Americe (hlavně Mexiko)^{42,41}, přibližně 70 druhů, a z toho 50 druhů roste v Ázii⁴³. Zatímco růst popínavých druhů je znám v Severní a Střední Americe a také v Ázii^{41,44}. I když se rostliny *Aristolochia* liší ve způsobu růstu kolem hostitelských rostlin, stupně dřevitosti, a nebo vývoje kůry, popínavý způsob růstu je pro ně charakteristický^{45,42}. Rostliny z čeledi podražcovitých rostou i v Evropě, a to přibližně 20 různých druhů. Hlavním nejznámějším druhem rostoucím v Evropě je *A. clematitis*, která se dá snadno rozlišit od ostatních druhů bylinných podražců rostoucích v mírném pásmu (**Obr. 6 A**). V obecném pojetí, rostliny čeledi *Aristolochiaceae* jsou opylované zejména dvoukřídlým hmyzem. Květy mají k tomu dokonale přizpůsobené svým tvarem, barvou,

vůní a zajímavostí je, že fungují i jako určitá „past“ pro hmyz. Vnitřní část květu je pokryta protichůdnými chloupky (**Obr. 6 B**), které brání hmyzu uniknout ven³⁵.



Obr. 6: Představitel rostlin čeledi podražcovitých. Nejvíce rozšířený druh ve Evropě, *A. clematitis* (**6 A**). Květ rostlin čeledi podražcovitých fungující jako past (**6 B**) (str. 23 a 24, převzato a upraveno z ³⁵).

V této kapitole jsme se konkrétně zaměřili na rostliny z rodu *Aristolochia*. Jak již bylo v úvodu zmíněno, mnoho různých druhů rostlin *Aristolochia* bylo po celém světě používáno v tradiční čínské medicíně (např. *Aristolochia debilis*, *A. contorta*, *A. manshuriensis* a *A. fangchi*) jako léky proti dně, artritidě, revmatu a chronického zánětlivého onemocnění kůže. Některé druhy pocházející ze severní Ameriky (např. *A. serpentaria*) se využívaly k léčbě hadího uštknutí³⁴. Sušené zralé plody rostlin *A. debilis* a *A. contorta* se používají k léčbě hemoroidů a jejich sušené stonky nebo listy se používají k léčbě edémů. Navíc se sušené kořeny *A. debilis* používají k léčbě závratí, bolestí hlavy, bolesti břicha, vředů a hadího uštknutí nebo bodnutí hmyzem. Naopak, co se týče použití sušených stonků *A. manshuriensis*, neexistují zatím žádné klinické informace, ale obvykle se používají v komplexních recepturách proti zánětu nebo jako diuretikum proti akutní

infekci močového systému. Neexistují rovněž žádné klinické informace týkající se použití rostliny *A. fangchi*, ale tato rostlina je též používána v komplexních předpisech jako diuretikum, antipyretikum a analgetikum. V **Tab. 1** jsou shrnuty jednotlivé části rostlin *Aristolochia* využívané v tradiční čínské medicíně⁴⁶.

Tabulka 1: Části rostlin *Aristolochia* využívaných v tradiční čínské medicíně⁴⁶

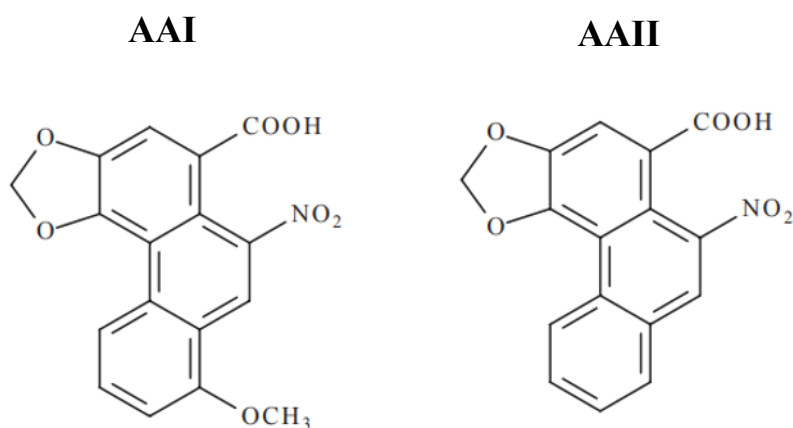
druh <i>Aristolochia</i>	využívaná část
<i>Aristolochia debilis</i>	plod, kořen, celá rostlina
<i>Aristolochia contorta</i>	plod, celá rostlina
<i>Aristolochia manshuriensis</i>	stonek
<i>Aristolochia fangchi</i>	kořen

Rostliny čeledi podražcovitých produkují mnoho různých sekundárních metabolitů včetně benzylochinolinových alkaloidů, aristolochových kyselin (AA) a aristolaktamů. Rostliny AA syntetizují z 1-benzylochinolinového prekursoru přes aporfinový intermediát⁴⁷. Většina rostlin obsahuje aristolochovou kyselinu I (AAI) a méně aristolochovou kyselinu II (AAII). AA pravděpodobně hrají významnou roli v ochraně rostlin před predátory⁴⁸. V letech 2004 až 2011 byly po celém světě zkoumány a charakterizovány různé chemické složky ve více než osmnácti druzích *Aristolochia*. Následně objevené sekundární metabolity byly klasifikovány podle svých chemických struktur a zahrnují aristolochové kyseliny a jejich estery, aristolaktamy, isochinoliny, benzylochinoliny, amidy, flavonoidy, kumariny, terpenoidy, benzenoidy, steroidy a další. Po objevení derivátů kyseliny aristolochové se rostliny z rodu *Aristolochia* staly zajímavým tématem pro fytochemické a farmaceutické studie⁴⁹. Nelze jednoznačně říci, zda vysoký obsah AA v rostlinách má ochranný účinek a zda se tyto sloučeniny opravdu podílejí na jejich obraně. Avšak v experimentech s myšími modely vystavenými AA, myši po několika dnech od vystavení umíraly na selhání ledvin⁴⁸. Nicméně, zájem o tyto rostliny se zvýšil po objevení karcinogenního a nefrotoxického vlivu na lidský organizmus daným toxikantem, AA³⁴. Také k tomu přispěly i výsledky dalších studií, kde byla prokázána tvorba specifického renálního onemocnění. Konkrétně bylo detekováno onemocnění nazvané podle

zdroje vývoje jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (z angl. „Chinese herbs nephropathy“, CHN). Po objevení této choroby se další studie zaměřily hlavně na negativní aspekty těchto rostlin⁵⁰.

2.2 Aristolochové kyseliny – přírodní toxikanty

Jak již bylo výše uvedeno, aristolochové kyseliny (AA) jsou nitrofenantrénové karboxylové kyseliny, které jsou přirozeně produkovány rostlinami rodu *Aristolochia* (čeledi podražcovitých)^{51,35}. Všechny AA, vyskytující se bezprostředně v přírodě, mají kostru kyseliny 3,4-methylenedioxy-10-nitro-fenantrenové-1, přičemž se uvádí osm různých AA, které byly nalezeny v rostlinách *Aristolochia*. Výskyt AA byl nalezen v rámci celých rostlin, tzn. AA jsou obsaženy v kořenech, v stonku, v listech i v plodu. Ze všech AA jsou v rostlinách nejvíce zastoupenými kyselinami **aristolochová kyselina I** (8-methoxy-6-nitro-fenanthro-[3,4-d]-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina, **AAI**) a její demethoxylovaný derivát **aristolochová kyselina II** (6-nitro-fenanthro-[3,4-d]-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina, **AAII**)^{52,34,49}. Jejich strukturní vzorce jsou uvedeny na **Obr. 7**.



Obr. 7: *Strukturní vzorce AAI a AAI (převzato a upraveno z ⁵²).*

Předchozí studie s AA poukazovaly na jejich terapeutické působení, včetně protinádorového, protizánětlivého, analgetického účinku a vlivu na regulaci krevního tlaku. Proto se běžně používaly v tradičních lécích a bylinných přípravcích k léčbě různých onemocnění jako je například ekzém, hepatitida, hadí uštknutí a mnoho dalších^{53,54}. Avšak

na počátku 90. let se pohled na jejich účinky změnil, a to po incidentu na jedné z bruselských klinik v Belgii s určitou kúrou zaměřenou na hubnutí. U pacientů se objevila onemocnění ledvin jako důsledek vlivu AA obsažených v léčebném přípravku, který obsahoval rostliny čeledi *Aristolochiaceae*. Uvedená událost přitáhla velkou pozornost po celém světě^{15,55}. Na základě tohoto incidentu Francouzské ministerstvo zdravotnictví v roce 1994 zakázalo prodej jakýchkoliv léků obsahujících AA⁵⁶. Nedávné studie byly zaměřeny na mechanismus vlivu těchto kyselin na lidský organizmus, tedy vlivu, který se stal základem projevu jejich nefrotoxicity a karcinogenity⁵⁷. Toxicita a mutagenita AA a jejich derivátů aristolaktamů byla nejintenzivněji studována v experimentech *in vitro*⁵⁸. Výsledky studií ukázaly, že AA hrají určitou roli ve vývoji různých typů rakovin, hlavně ve vývoji urotheliálních karcinomů. Vystavení organismů působení AA v některých případech způsobuje velmi vysokou mutační zátěž⁵⁹. Na základě daných skutečností je nezbytná analýza těchto biologických toxikantů z fyziologického a farmaceutického hlediska a je nutné zkoumání patogenetického vlivu AA na ledviny⁵³.

2.2.1 Metabolizmus aristolochových kyselin

Metabolizmus obecně představuje biotransformační proces přeměny exogenních nebo endogenních sloučenin na jejich polárnější formu za účelem efektivnější eliminace z těla. Tělu cizí sloučeniny včetně léčiv, se nazývají **xenobiotika**. Biotransformace xenobiotik probíhá alespoň ve dvou fázích. **První fáze** biotransformace zahrnuje reakce zajišťující transformaci parentálních molekul na polárnější metabolity, a to buď odkrytím polárních skupin nebo vytvořením polárních funkčních skupin *de novo* (např. -OH, -NH₂, -SH). Tyto přeměny zabezpečují oxidační, redukční a hydroxylační reakce⁶⁰. **Druhá fáze** biotransformace zahrnuje konjugací reakce umožňující další zvýšení hydrofilnosti metabolitu ve srovnání s původní molekulou prostřednictvím glukuronidace, sulfatace, acetylace, konjugace s glutathionem a podobně^{61,62}. Enzymy participující na druhé fázi biotransformace hrají důležitou roli při metabolické detoxikaci xenobiotik. Snížená kapacita těchto enzymů může totiž vést k toxickému vlivu cizorodých sloučenin. Navíc nedostatek enzymů a genetický polymorfismus těchto enzymů může často hrát roli při vývoji několika forem rakoviny⁶². To znamená, že reaktivní meziprodukty nebo metabolity tvořené v průběhu biotransformace se vážou na DNA, a to může způsobovat dané mutace u postižených pacientů^{37,36}. Někdy biotransformace xenobiotik probíhá i v tzv. **třetí fázi**. Zde

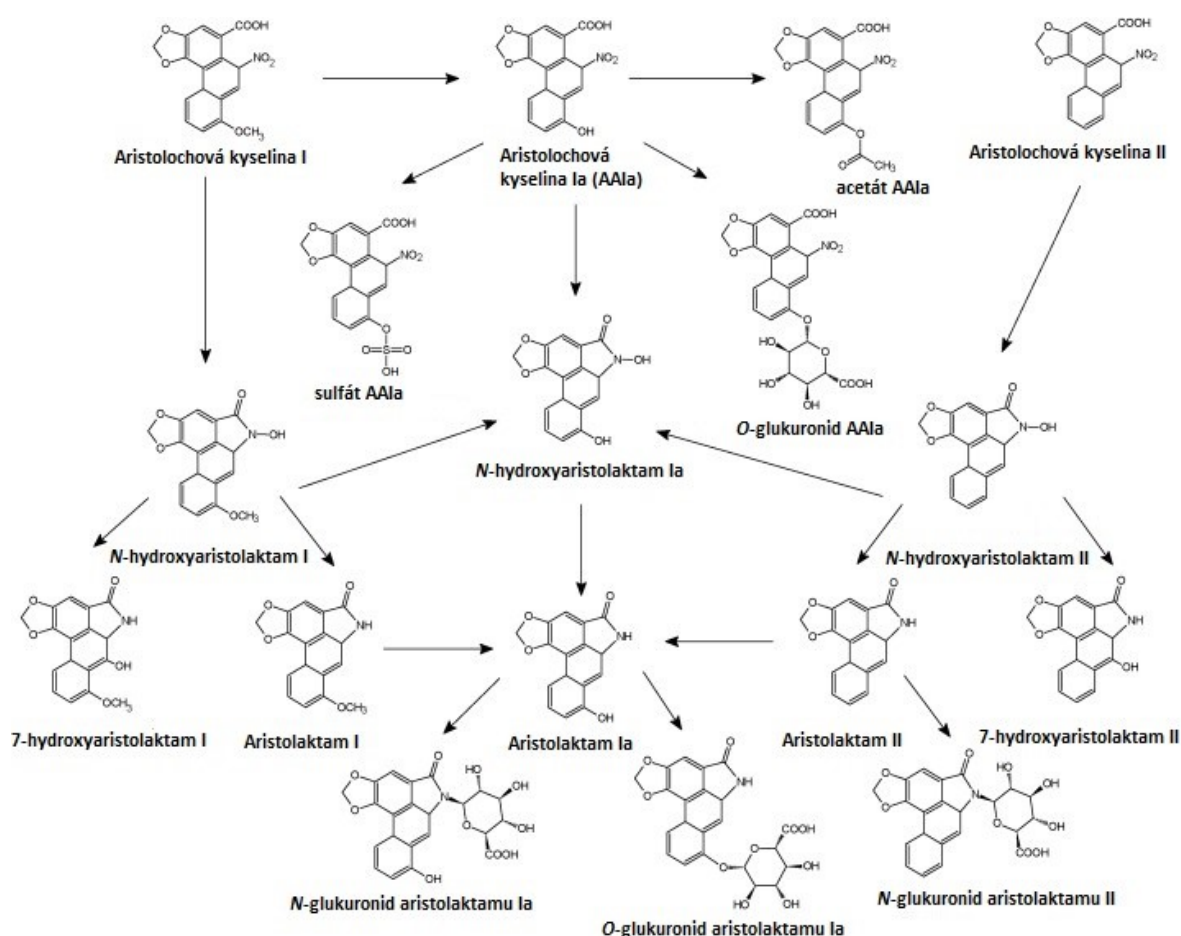
se však nejedná o pravou biotransformaci, ale týká se funkce transportérů důležitých pro eliminaci léčiv (xenobiotik) nebo jejich metabolitů⁶¹.

Metabolismus AA byl studován v různých organizmech, včetně člověka⁶³. AA po intoxikaci organismu jsou absorbovány prostřednictvím gastrointestinálního traktu do krevního oběhu a následně v nezměněné a/nebo metabolizované formě jsou distribuovány po celém těle⁶⁴. AA v první fázi biotransformace podléhají hydroxylaci, tvorbě laktamů, denitrosaci a demethylaci (v případě AAI). Ve druhé fázi biotransformace, podléhají AA hlavně *N*-glukuronidaci. U pacientů trpících nefropatiemi byly v moči identifikovány pouze redukční metabolity aristolaktam I a II¹⁵. V moči potkanů však byly identifikovány také *N*- a *O*-glukuronidy, a navíc také acetátové a sulfátové estery⁶⁵.

2.2.1.1 Redukční aktivace aristolochových kyselin v organizmech

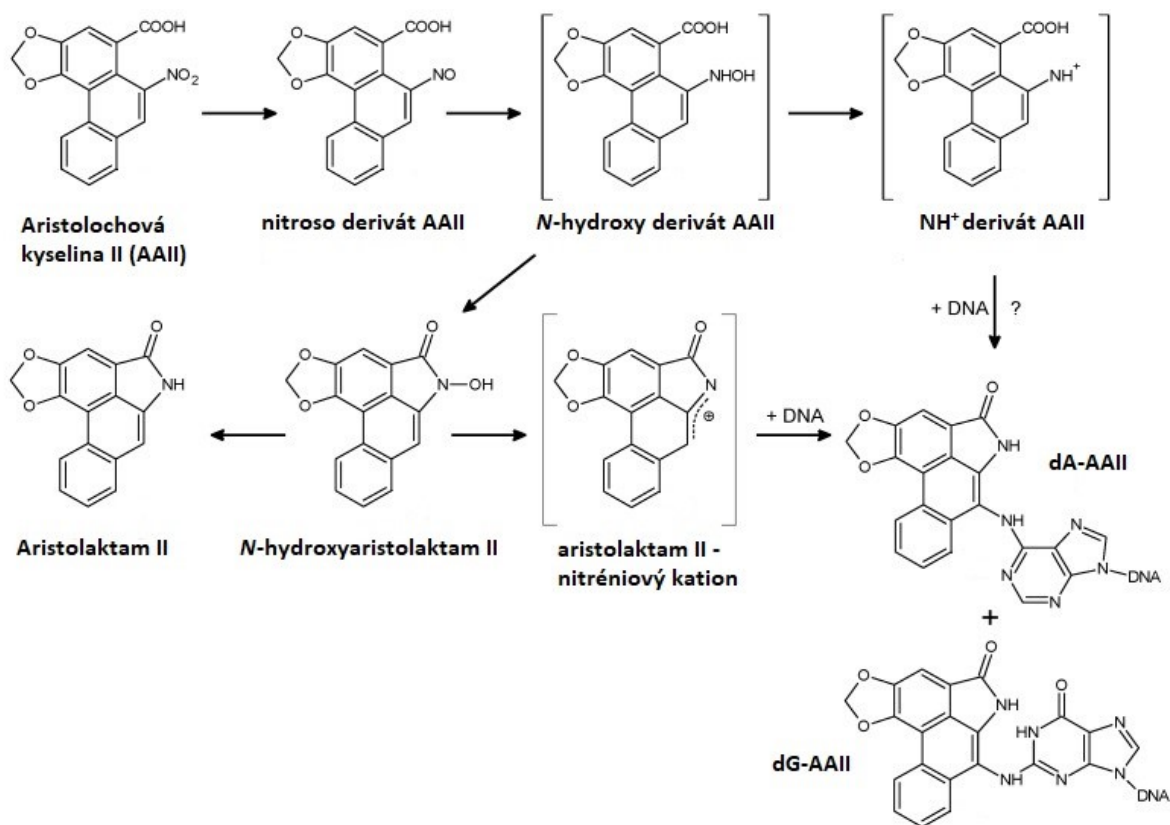
Hlavní aktivační dráhu AA představuje redukce jejich nitroskupiny. Experimenty *in vitro* poukázali na to, že AA jsou metabolizovány hlavně na *N*-hydroxyaristolaktamový *intermediát*, který může být dále redukován na **aristolaktam (Alac)** nebo dojde k přeskupení hydroxylové skupiny prostřednictvím tzv. Bambergerova přesmyku za vzniku *7*-hydroxyaristolaktamového derivátu (**Obr. 8**)⁶⁵. Za společný koncový metabolit AAI a AAII v první fázi biotransformace by mohl být považován **aristolaktam Ia (AlacIa)**. Ten může vznikat nitroredukcí AAIIa (oxidační derivát AAI, **kap. 2.2.1.2**), demethylací AlacI (redukční derivát AAI) a popřípadě hydroxylací AlacII (redukční derivát AAII, **Obr. 8**)⁶⁰. V rámci druhé fáze biotransformace AA bylo v moči a výkalech experimentálních modelů hlodavců identifikováno velké množství metabolitů AAI i AAII, a to zejména v konjugované formě s kyselinou glukuronovou, sulfátem a acetátem. Redukční metabolit AAII, AlacII, konjugovaný hlavně *N*-glykosidickými vazbami s kyselinou glukuronovou. Podobně i u konjugovaných redukčních metabolitů AAI byly identifikovány *N*- a *O*-glykosidické konjugáty s kyselinou glukuronovou^{60,64,65}. Na základě zjištěných poznatků můžeme tedy považovat aristolaktamy jako hlavní metabolity redukční dráhy AAI i AAII, které jsou identifikovány ve své volné nebo konjugované formě v moči i ve stolici^{64,60}. Nicméně, samotné aristolaktamy pravděpodobně nejsou mutagenní, ale v průběhu redukční aktivace AA metabolickým systémem organismů vzniká aristolaktam-nitréniový kation ochotně interagující s DNA za vzniku kovalentních aduktů^{36,60,64-66}. V důsledku toho se AA z genetického hlediska jeví stejně genotoxicky aktivní jak v testech *in vivo*, tak i v *in vitro*³⁶.

Hlavní aktivační dráha AA spojená s redukcí nitroskupiny je katalyzována cytoplazmatickými i mikrosomálními enzymy. Nejúčinnějším jaterním a ledvinným cytosolárním enzymem participujícím na aktivaci AA je enzym **NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NQO1)** a na aktivaci také participuje **xanthinoxidasa**^{67,68}. Na redukcí nitroskupiny se také podílejí **cytochromy P450 (CYP)**, konkrétně CYP1A1/A2^{69,67}, nacházející se v membráně endoplasmatického retikula a jejich redoxní partner **NADPH:CYP reduktasa (POR)**⁶⁸⁻⁷⁰. Již výše bylo zmíněno, v aktivační dráze AAII vzniká elektrofilní cyklický *N*-acylnitréniový ion, který ochotně reaguje s purinovými bázemi za tvorby aduktů s DNA. Tyto specifické adukty DNA s AA byly též identifikovány i v experimentálních zvířatech premedikovaných AA. Ty byly rovněž detekovány u pacientů postižených nefropatií vyvolanou právě AA^{36,71}. Příslušné adukty s DNA se využívají jako biomarkery vystavení organismů působení AA a na zjišťování mutagenního a karcinogenního potenciálu AA³⁶.



Obr. 8: Schéma biotransformace AAI a AAI (str. 28, převzato a upraveno z ⁶⁹).

Struktury hlavních aduktů AA s DNA byly objasněny spektroskopicky. Jedná se 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I a II (**dA-AAI** a **dA-AAII**) a 7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I a II (**dG-AAI** a **dA-AAII**)^{70,72}. Struktura těchto aduktů signalizuje, že cyklický *N*-acylnitréniový ion s delokalizovaným nábojem se přednostně váže na exocyklické amino skupiny purinových bází (**Obr. 9**) nebo podléhá hydrolyze na příslušné 7-hydroxyaristolaktamy (**Obr. 8**)³⁶. Je známo, že acetylace amino- nebo hydroxyamino- skupiny nitroaromátů a aromátů hraje klíčovou roli v aktivaci těchto karcinogenů. Z tohoto důvodu je aktivace AA unikátním příkladem intramolekulární acylace vedoucí ke vzniku tzv. ultimativního karcinogenu⁶⁹.



Obr. 9: Redukční aktivace AAI a AAI vedoucí ke vzniku příslušných aduktů s DNA. ? – představuje další možní dráhu vzniku aduktů (převzato a upraveno z ⁷²).

2.2.1.2 Oxidační detoxikace aristolochových kyselin v organizmech

Při biotransformaci AA existují dvě různé možné cesty. Jedna vede k tvorbě aktivních genotoxických meziproduktů, danou cestu jsme již rozebírali v předešlé **kap. 2.2.1.1**. Druhá cesta biotransformace vede k detoxikaci AA (zejména AAI) za účelem snížení jejich koncentrace v organismu⁷². Cytochromy P450 vykazují dvojí katalytickou funkci. Participují na redukční aktivaci AA, ale i při jejich oxidační detoxikaci⁷³. Dvojí úloha CYP1A1/A2 v metabolismu AAI může být způsobena tím, že AAI je ligandem pro tyto uvedené enzymy při nízké, resp. žádné koncentraci kyslíku, a proto následně dochází k redukci AAI místo oxidaci^{74,75}. Při aerobních podmínkách je AAI klasickým substrátem CYP1A1/A2, a proto přednostně dochází k demethylaci methoxy skupiny za vzniku **aristolochové kyseliny Ia (AAIa, Obr. 8)**^{76,77}. Na oxidační detoxikaci AAI se podílejí i cytochromy P450 podrodiny 2C9 a 3A4, ale s mnohem nižší efektivitou, a vzhledem k orientaci AAI v aktivní centru enzymů vážou méně tuto kyselinu v porovnání s podrodinou CYP1A⁷⁷. Rozsah nitroredukce nebo *O*-demethylace AAI může být všeobecně ovlivněn koncentrací kyslíku, zatímco u AAI koncentrace kyslíku může mít vliv pouze na nitroredukci⁷⁸. V experimentech *in vitro* s potkaními jaterními mikrosomy inkubovanými s AA za anaerobních podmínek, byly identifikovány příslušné redukční metabolity AlacI a AlacII. Ovšem zajímavostí je, že AAI byla metabolicky stabilní i vůči aerobní inkubaci, zatímco AAI byla intenzivně demethylována⁷⁹. Nedávné studie prokázaly, že AAI pravděpodobně vůbec nepodléhá oxidaci. V experimentech *in vitro*, při inkubaci AAI s mikrosomální frakcí za aerobních podmínek nebyl identifikován oxidační derivát AAIa a ani žádné jiné oxidační produkty⁸⁰. Podobné výsledky byly zjištěny i *in vivo*, v experimentálních potkaních modelech premedikovaných AAI⁸¹. Za aerobních i anaerobních podmínek byly pozorovány stejné adukty DNA s AAI, zatímco adukty s AAI byly pozorovány pouze v anaerobních podmínkách³⁶. Uvedené výsledky naznačují, že hlavní metabolickou dráhou AAI je tedy redukce nitro skupiny, včetně vzniku metabolitu AlacII, která dále vede ke vzniku aduktů DNA s AAI^{60,69}. Tyto předpoklady je však nutné prokázat dalšími experimenty (studiemi).

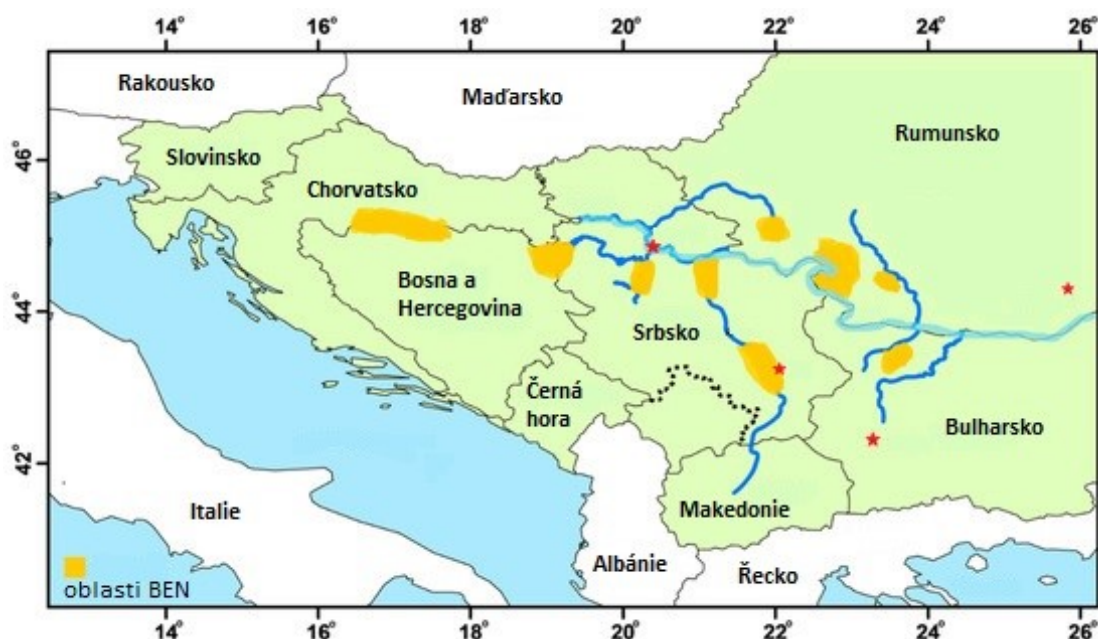
2.2.2 Onemocnění vyvolaná aristolochovými kyselinami

Byliny nebo extrakty z bylin čeledi *Aristolochiaceae* byly prvními léky široce používanými na celém světě díky svým farmakologickým účinkům. Většina léčebných postupů se používá v medicíně, ale také pro kosmetické přípravky^{82,83}. Zejména tradiční čínská medicína se využívá po tisíce let k prevenci a léčbě různých onemocnění⁸⁴.

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* (rod *Aristolochia*) se využívaly ve velké míře pro přípravu bylinných přípravků do té doby, dokud se neprokázalo, že AA přítomné v těchto rostlinách mají vysoce nefrotoxický a karcinogenní vliv na lidský organismus^{85,86}. Přestože používání rostlin čeledi podražcovitých je na celém světě zakázáno, bohužel se stále objevují důkazy, že jsou nadále používány⁵¹.

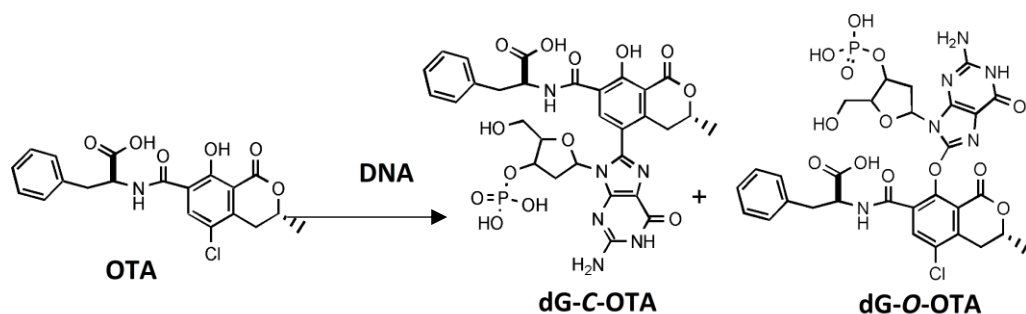
2.2.2.1 *Balkánská endemická nefropatie*

Přes více než 60 let se u obyvatel venkovských oblastí v Bosně a Hercegovině, Bulharsku, Chorvatsku, Rumunsku a Srbsku objevovaly s vysokou prevalencí renální onemocnění, označované jako **Balkánská endemická nefropatie** (z angl. „Balkan endemic nephropathy“, **BEN**). Je zřejmé, že je geograficky limitovaná podél řeky Dunaje v rámci jejich přítoků ve zmíněných zemích (**Obr. 10**)^{87,88}. Tím, že je geograficky limitovaná se může vyskytovat třeba pouze v určitých domácnostech⁸⁹. Uvedená nefropatie představuje jedinečné chronické onemocnění ledvin s pomalou, ale zato progresivní ztrátou jejich funkce^{87,90}. Environmentální forma dané nefropatie vyvolané AA je charakterizována relativně pozdním nástupem a je provázená mírnější formou hypertenze⁹¹. BEN představuje familiární, pomalu progresivní nemoc intersticiálních tubulů ledvin charakterizovanou tubulární proteinurií, mírnou hypertenzí a v pozdějším pokročilém stádiu těžkou anémií⁹². **Urotheliální rakovina horních močových cest** (z angl. „upper urothelial cancer“, **UUC**) je pravděpodobně nejčastější příčinou smrti pacientů trpících danou nefropatií. Avšak samotné nádory obvykle vznikají později než intersticiální nefropatie a jejich incidence narůstá se zvyšujícím se věkem. U pacientů trpících nefropatií může být zvýšené riziko vzniku UUC i po transplantaci ledvin. Avšak prevalence UUC u pacientů s transplantací a bez ní je výrazně odlišná, což potvrzuje fakt spojitosti vzniku UUC s BEN^{89,93-95}.



Obr. 10: Mapa znázorňující geografické oblasti výskytu BEN v blízkosti přítoků Dunaje v zemích Balkánského poloostrova (str. 32, převzato a upraveno z ⁵¹).

Navzdory mnohaletého intenzivního výzkumu etiologie BEN se nepodařilo prokázat přesný původ vzniku tohoto onemocnění^{96,97}. Existuje několik hypotéz vzniku BEN. První hypotéza etiologie BEN je založena na skutečnosti, že obyvatelé v povodí Dunaje byli vystaveni působení **ochratoxinu A (OTA)**, a to ve vysokých koncentracích^{98,99}. OTA je přirozeně se vyskytující chlorofenolický toxin nacházející se v různých typech hub. Široká škála potravinářských výrobků jím může být kontaminována, což představuje hrozbu pro člověka¹⁰⁰. Ačkoli mechanismus tvorby nádorů indukovaných OTA není znám, z výsledků experimentů je zřejmé, že OTA může interagovat s DNA za vzniku aduktů (**Obr. 11**)¹⁰¹. Avšak mechanismus jeho vlivu na vývoj rakoviny ledvin je stále kontroverzní otázkou¹⁰⁰.



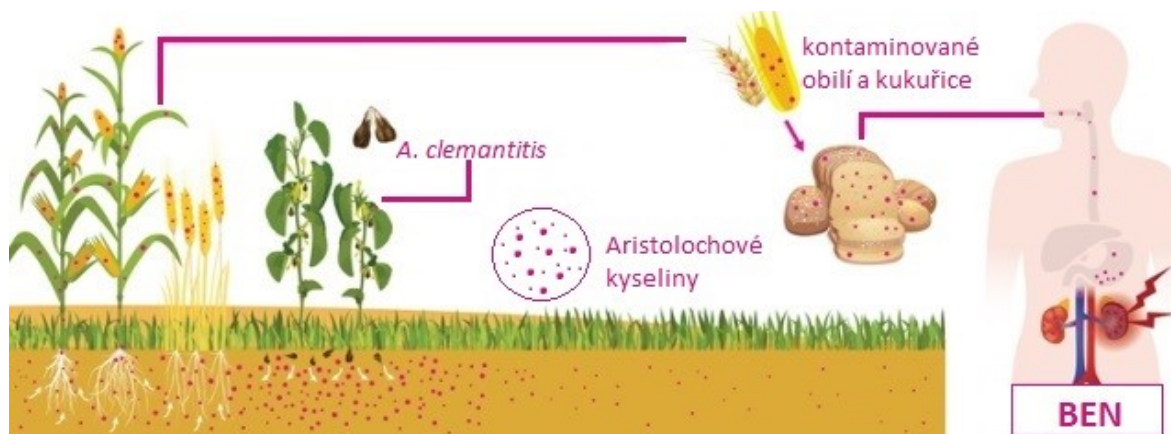
Obr. 11: Adukty OTA s DNA (převzato a upraveno z ¹⁰²).

Další z hypotéz vzniku BEN je založená na kontaminaci půdy **ionty kovů a polokovů**. Tato hypotéza byla založena na poznatcích přítomnosti iontů některých z nich, jako je olovo, měď, zinek, hliník baryum, chrom, nikl a pod. ve vodě a v půdě oblastí výskytu BEN¹⁰³. Nicméně analýza iontů kovů v příslušných vodách a půdě v daných oblastech poukázala na jejich koncentraci téměř pod detekčními limity analytických metod. Tedy ionty kovů (např. kadmia, olova) a polokovů (např. arsen, selen) nehrají zřejmě důležitou roli ve vzniku BEN^{104,105}.

Další hypotézou je **lignitová hypotéza**, která je založená na geografické shodě ložisek lignitu s endemickými oblastmi. Předpokládá se, že toxické složky uvolněné z lignitu mohly kontaminovat podzemní vody, a tím pádem i studny s pitnou vodou. I když jejich koncentrace ve vodě není vysoká, dlouhodobé vystavení obyvatelstva a s následnou akumulací lignitových složek může mít nepříznivé následky na zdraví, včetně příznaků BEN^{106-109,104}. Naopak jiné studie zjistily, že nebyly detekovány žádné rozdíly v míře koncentrace daných sloučenin v endemických a neendemických oblastech¹¹⁰. Na základě řady skutečností expozice se složkám lignitu, není jejich úloha v etiologii BEN zřejmě relevantní¹¹¹.

V průběhu posledního desetiletí se prokázal kauzální vliv **AA** na vzniku BEN, a to včetně vývoje UUC¹¹². Otázka citlivosti populace vůči vystavení působení těchto toxinů nemá dosud úplně jasnou odpověď. Rostliny druhu *A. clematitis* rostou ve velkém množství v mnoha endemických oblastech Balkánského poloostrova. Předpokládalo se, že semena z této rostliny mohla být smíchaná spolu s obilím během sklizně, a tím by došlo ke kontaminaci potravinových produktů AA^{113,114}. Tomuto předpokladu přispěla skutečnost, že tyto rostliny rostou v těsné blízkosti zemědělských plodin (např. kukuřice, pšenice, **Obr. 12**)¹¹⁵. Avšak tato teorie možné expoziční dráhy zůstala kontroverzní z různých důvodů. Semena *A. clematitis* dozrávají v jiném čase než pšeničná zrna a při možné sklizni *A. clematitis* teprve kvetla. Navíc plody této rostliny jsou mnohem větší v porovnání s velikostí zrna a v procesu zpracování zrn by byly plody této rostliny odděleny. Kromě toho, teorie nevysvětluje endemickou povahu BEN, protože dané rostliny rostou i v jiných zemích Asie, Evropy a Severní Ameriky^{116,97}. Nové světlo do dané teorie vneslo zjištění, že rostliny *A. clematitis* se časem rozpadají, a tím se toxické AA uvolňují do půdy, kde se zadržují. Následně rostliny, v tomto případě obiloviny rostoucí v těchto oblastech absorbují AA z půdy pomocí kořenů a ukládají je do zrn (**Obr. 12**)^{117,115}. Díky uvedenému zjištění se nové

výzkumy zaměřují na sledování určitých aduktů DNA s AA jako biomarkerů možného vystavení organismu AA¹¹¹.



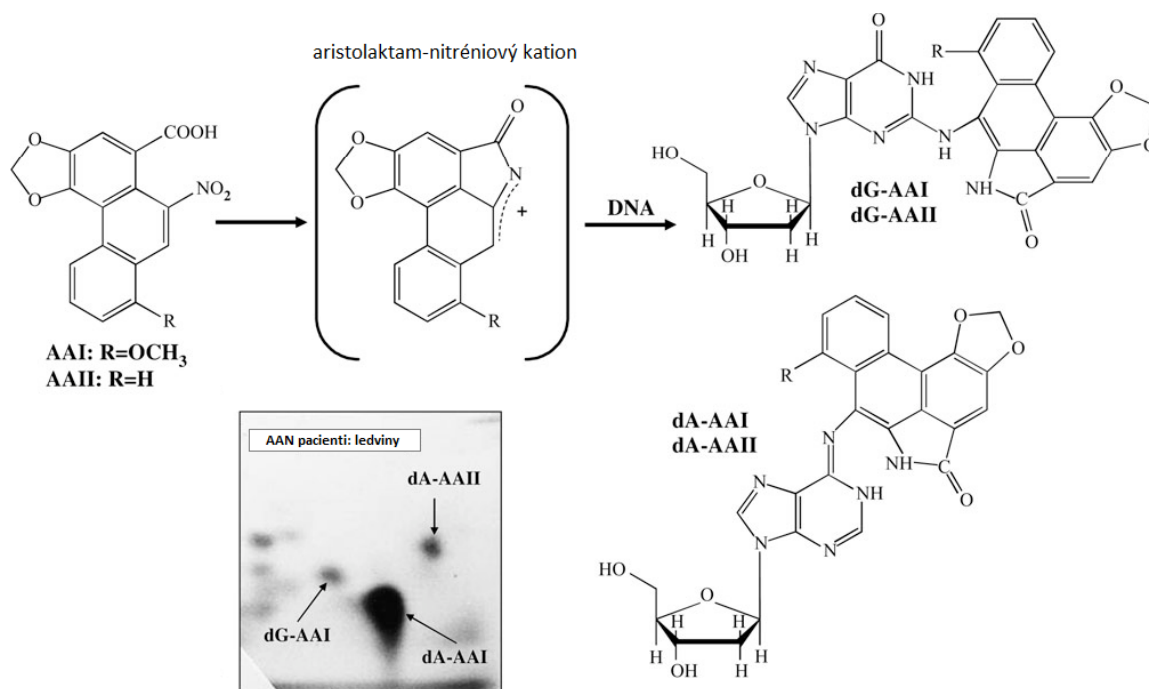
Obr. 12: Schéma kontaminace obilnin rostlinami rodu *Aristolochia* (str. 34, převzato a upraveno z⁹⁷).

2.2.2.2 Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami

Nefropatie vyvolaná působením AA (z angl. „Aristolochic acid nephropathy“, AAN) je obecný pojem jakékoli formy nefropatie způsobené buď použitím rostlin obsahujících AA jako součást tradiční čínské medicíny (dříve známá také jako nefropatie vyvolána čínskými bylinami, z angl. „Chinese herbs nephropathy“, CHN) nebo způsobené kontaminací potravin AA (BEN)¹¹⁸.

V roce 1992 se v jisté bruselské klinice v Belgii, kde byli zaměřeni na léčbu obezity, tedy redukci tělesné hmotnosti, se objevily první zprávy vývoje AAN. A to u žen trpících prudkým selháním ledvin vyžadujícím léčbu dialýzou nebo transplantací ledvin¹¹⁹. Součástí kúry bylo užívání „pilulek“ obsahujících čínské byliny (na základě tohoto faktu byl prvotní název onemocnění daného typu jako CHN)^{119,120}. Analýzy obsahu „pilulek“ odhalily, že došlo k záměně jedné ze složek, rostliny *Stephania tetrandra* za rostlinu *Aristolochia fangchi*. Daný omyl byl způsoben v důsledku podobného čínského názvu¹²¹. Od incidentu na Belgické klinice bylo v následujících desetiletích hlášeno mnoho případů AAN po celém světě, a to zejména v asijských zemích, kde je používání tradiční medicíny populární^{122,123}. Klíčová role AA v nefropatii CHN/AAN byla potvrzena až detekcí aduktů DNA s AA v ledvinách pacientů nimi trpících. Uvedené adukty potvrdily expozici pacientů AA, a tím i

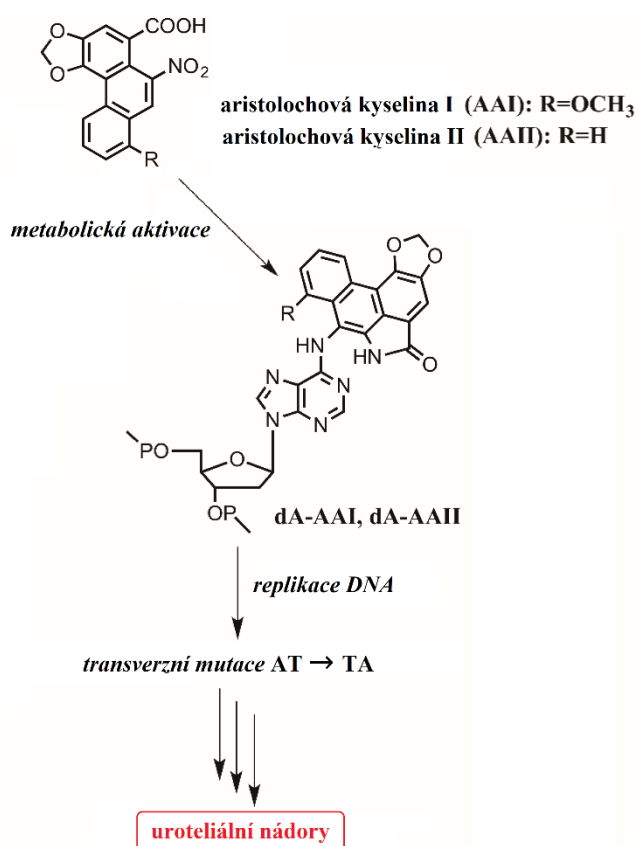
jejich kauzální souvislost s vývinem nefropatie (**Obr. 13**)^{124,125}. Na základě daných poznatků bylo upuštěno od názvu CHN, které bylo nahrazeno přesnějším názvem AAN¹²³.



Obr. 13: Metabolická aktivace AAI a AII vedoucí k tvorbě příslušných aduktů s DNA: dA-AAI nebo 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam II a 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)aristolaktam I nebo II (dG-AAI nebo dG-AII). Autoradiografický profil DNA aduktů získaných z ledvinové DNA pacienta trpícího AAN s použitím metody ³²P-postlabelling (převzato a upraveno z ⁵⁹).

Charakteristickým znakem většiny případů bylo rychlé selhání funkce ledvin pacientů po intoxikaci AA¹²⁶. Ledviny pacientů měli asymetrický tvar, byly smršťené a měly nepravidelnou kortikální linii. Bioptické vyšetření intoxikovaných ledvin odhalilo fibrózu tkáně spolu se ztrátou tubulů periferního kortexu^{120,119}. AAN je podobně jako i výše zmíněná nefropatie (BEN) spojená s vývinem UUC¹¹⁸. Analýzy tkání pacientů odhalily, že jsou to právě AA, jež tvoří významný rizikový faktor při rozvoji urotheliálního karcinomu¹²⁵. Již výše bylo uvedeno, že aktivací AA může vznikat aristolaktam-nitréniový kation, který je považován za ultimativní karcinogen. Tento zmíněný ion se prioritně váže na exocyklické amino skupiny purinových nukleotidů v DNA. Nejčastějšími adukty s AA s DNA jsou dA-AAI, dA-AII a dG-AAI, dG-AII. Dominantním a nejdéle přetrvávajícím aduktem je dA-AAI. V dřívějších studiích bylo prokázáno, že uvedený adukt (dA-AAI) je zodpovědný za transverzi AT → TA (**Obr. 14**)^{127,69,36}. Uvedená specifická transverzní mutace v genu *p53*

(konkrétně v kodonu 139) sehrává klíčovou roli, protože dochází k záměně kodonu AAG \rightarrow TAG, tzn. aminokyseliny Lys za stop kodon^{128,102}. Daná mutace byla převážně objevena u pacientů trpících oběma zmíněnými nefropatiemi (AAN i BEN). Kromě toho však byla objevena i u pacientů trpících UUC, kteří ale nebyli vystaveni AA. Nicméně incidence výskytu urotheliálních nádorů u těchto pacientů byla velmi vzácná. Vzhledem k dané skutečnosti lze tedy předpokládat, že výše uvedená transverzní mutace AT \rightarrow TA je charakteristická pro vystavení organismů právě AA^{127,120}. Podobná transverze AT \rightarrow TA byla objevena i v kodonu 61 genu *H-ras* (proto-onkogen u myši a potkanů, **Obr. 14**)¹²⁸.



Obr. 14: Postulované mechanismy nefrotoxického a karcinogenního vlivu aristolochových kyselin (str. 36 a 37, převzato a upraveno z⁵¹).

3 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo objasnit metabolismus aristolochových kyselin, a to zejména aristolochové kyseliny II (AAII). Studium enzymů participujících jak na redukční aktivaci, tak i oxidační detoxikaci AAII bylo konkrétně realizováno v experimentech *in vitro* a také ve zvířecích, potkaních, modelech *in vivo*. V obou podmínkách, *in vitro* i *in vivo*, byl sledován vliv samotné AAII a směsí obou aristolochových kyselin na aktivační biotransformaci AAII a vzniku aduktů AAII s DNA.

Cíle této práce lze shrnout následovně:

- 1) Potvrzení tvorby finálního redukčního metabolitu AAII, aristolaktamu II (AlacII) za experimentálních podmínek *in vitro* a *in vivo*.
- 2) Sledování možné tvorby oxidačních metabolitů AAII (AAIIa) za experimentálních podmínek *in vitro* a *in vivo*.
- 3) Sledování tvorby aduktů AAII s DNA za experimentálních podmínek *in vitro* a *in vivo*.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál a chemikálie

Použitý materiál a chemikálie pochází z uvedených zdrojů:

Fluka, Švýcarsko

1,1,1-tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), tokoferol (vitamin E), Tween 20 (10 %)

Lachema, ČR

glycerol, KCl, methanol, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

Lachner, ČR

ethylacetát, kyselina chlorovodíková (35 %), kyselina octová (99 %)

Linde, ČR

argon, tekutý dusík

SERVA, Německo

1,1,1-tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Sigma, USA, Belgie

AAII, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH, NADP^+ , triethylamin

VWR Chemicals, Francie, USA

acetonitril, methanol

AAIa – izolována z experimentů oxidace AAI jaterním mikrosomálním systémem potkanů

AlacI, **AlacII** – dar doc. H.H. Schmeisera (Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu)

4.2 Přístroje

Automatické mikropipety

Eppendorf (Německo)

Centrifugy

Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (Německo)

K-23, Janetzki, výkyvný rotor (Německo)

K-24, Janetzki, úhlový rotor (Německo)

Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45 (USA)

Inkubátor

Eppendorf Thermomixer compact (Německo)

Magnetická míchačka s ohřevem

RMO 2 Basic – IKA-Werke (Německo)

pH metr

HI 2211 pH/ORP Meter – HANNA Instruments Inc. (Rumunsko)

Sonikátor

ELMAsonic E 30 H – ELMA (Německo)

Systém HPLC

Systém 1:

Pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS detector UVD 170S/340S (USA)

Degasys DG-1210 Dionex

Termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101 (ČR)

Předkolona: Nukleosil 100-5 C18, 4 x 8 mm, Macherey-Nagel (Německo)

Kolona: Nukleosil 100-5 C18 HD, 4 x 250 mm, Macherey-Nagel (Německo)

Program: Chromeleon™ 6.11 build 490

Systém 2 (Agilent Technologies 1200 Series, USA):

Pumpa: Quaternary pump G1311A

Standard Autosampler (ALS) G1329A

Diode Array Detector SL (DAD) G1315C

Vacuum degasser G1322A

Termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101 (ČR)

Předkolona: Nukleosil 100-5 C18, 4 x 8 mm, Macherey-Nagel (Německo)

Kolona: Nukleosil 100-5 C18 HD, 4 x 250 mm, Macherey-Nagel (Německo)

Program: ChemStation for LC 3D systems, Rev.B.04.02[98]

Vortex

VF2 – JANKE & KUNKEL IKA-L Labotechnik (Německo)

Další přístroje

Analytické váhy Discovery – OHAUS (Švýcarsko), homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

4.3 Metody

4.3.1 Izolace jaterní mikrosomální a cytosolární frakce z potkaních modelů

Izolace jaterní mikrosomální a cytosolární frakce z potkaních modelů probíhala v naší laboratoři na katedře biochemie a byla prováděná Mgr. Františkem Bartem, PhD. a Bc. Alenou Dedíkovou. Premedikace potkaních modelů probíhala v laboratoři Státního zdravotního ústavu v Praze a byla prováděna Dr. Jaroslavem Mrázem a Ing. Šárkou Duškovou. Potkani byli vystaveni AAI (1 mg), AAII (1 mg) a směsí obou kyselin AAI s AAII (1 mg + 1 mg). Jednotlivé frakce (mikrosomální a cytosolární) jaterní tkáně potkaních modelů vystavených působení AAI, AAII, směsí AAI s AAII a potkaních modelů bez premedikace tzv. „kontroly“, byly izolovány dle postupu popsaneho v dřívějších pracích^{130,131}.

4.3.2 Redukce AII reduktasami potkaních jaterních mikrosomů a cytosolů

Experiment pro stanovení redukce AII v „kontrolních“ potkaních jaterních mikrosomech a cytosolech z nepremedikovaných potkanů byl dvakrát opakován. Celkový objem inkubačních směsí byl 750 μ l.

Složení inkubačních směsí:

- Pufr: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 % Tween 20
 - Koncentrace proteinů v potkaních jaterních cytosolech/mikrosomech ($c_{\text{cytosolů}} = 22,9$ mg/ml; $c_{\text{mikrosomů}} = 32,5$ mg/ml)
 - AII rozpuštěná v ethanolu
 - NADPH rozpuštěn v destilované vodě ($c = 1$ mM)
-
- *Redukce AII potkaním jaterním cytosolárním subcelulárním systémem:*
do inkubačních směsí bylo přidáno 660,4 μ l pufru, 12,3 μ l cytosolů, 10 μ M AII a nakonec 75 μ l NADPH
 - *Redukce AII potkaním jaterním mikrosomálním subcelulárním systémem:*
do inkubačních směsí bylo přidáno 659 μ l pufru, 4,3 μ l mikrosomů, 10 μ M AII a nakonec 75 μ l NADPH

Dané reagenty byly přidávány do inkubačních směsí v příslušném pořadí, jak je uvedeno výše, kromě NADPH. Redukční prostředí v inkubačních směsí bylo zajištěno „probubláním“ argonem po dobu 60 vteřin. Následně bylo do směsí přidáno NADPH a inkubační směsi byly opět nasyceny argonem. Inkubační směsi byly inkubovány po dobu 60 minut za stálého třepání (450 RPM, *Thermomixer Eppendorf compact*) při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 750 μ l ethylacetátu a pro lepší extrakci metabolitů AII byly inkubační směsi 5 minut intenzivně třepány (1 400 RPM, *Thermomixer Eppendorf compact*). Následně byla organická fáze oddělena centrifugací (3 000 RPM, 3 min., *centrifuga 5418, Eppendorf, úhlový rotor*). Odebrané organické fáze byly odpařeny v digestoři (přes noc) a dále uchovány při teplotě -20 °C. Redukce AII a vznik jejich metabolitů byly analyzovány metodou HPLC s reverzní fází (RP-HPLC). Extrakty

z jednotlivých inkubačních směsí byly před samotnou analýzou rozpuštěny v 30 μ l methanolu.

4.3.2.1 Analýza metabolismu AAI prostřednictvím vysokotlakové (vysokoúčinné) kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)

Látky obsažené v inkubačních směsích byly analyzovány metodou RP-HPLC. Pro analýzu byla použita kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35 °C. Příslušné roztoky mobilních fází byly připraveny těsně před analýzou a filtrovány pro odstranění částic a plynů. Standardy AAI, AAI, AlacI a AlacII byly připraveny přidáním 2 μ l příslušného standardu k methanolu (celkový objem 30 μ l). Na kolonu bylo vždy nanášeno 20 μ l vzorku. Na základě optimalizačních experimentů pro RP-HPLC, separace standardů probíhala ve dvou uspořádáních (metoda 1 a 2)¹³².

(1) Metoda 1

Separace AAI, AAI a AlacI probíhala v gradientovém uspořádání o proměnném složení mobilní fáze ze 100 % A a 0 % B na konečné složení 50 % A a 60 % B. Mobilní fáze byly složeny ze směsi (A) 100 mM triethylaminacetát (TEAA; pH 7,0; úprava pH kyselinou octovou); 20 % acetonitril a (B) 80 % acetonitril. Jedna eluce probíhala 35 minut při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.

(2) Metoda 2

Separace AlacII probíhala v izokratickém uspořádání podle práce Mgr. P. Burdy¹³². Mobilní fáze byla složená ze směsi methanolu, destilované vody a kyseliny octové v poměru 65:34:1. Eluce standardu (AlacII) probíhala dokud nebyl eluován hlavní pík této sloučeniny při průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

Inkubační směsi redukce AAI a standardy separovány metodou 1 byly analyzovány Systémem 1 HPLC (**kap. 4.2**). Systémem 1 HPLC byl také analyzován standard AlacII, který byl separován metodou 2. Inkubační směsi redukce AAI a standard AAI separovány metodou 2 byly analyzovány Systémem 2 HPLC (**kap. 4.2**). Separované látky obsažené v extraktech a samotné standardy byly detekovány při vlnové délce 250 nm.

4.3.3 Oxidace AaII oxidoreduktasami potkaních jaterních mikrosomů

Experiment pro stanovení oxidace AaII v „kontrolních“ potkaních jaterních mikrosomech z nepremedikovaných potkanů byl dvakrát opakován. Celkový objem inkubačních směsí byl 500 μ l.

Složení inkubačních směsí:

- Fosfátový pufr: 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4
- Koncentrace proteinů v potkaních jaterních mikrosomech ($c = 0,5$ mg/ml)
- AaII rozpuštěná v ethanolu
- NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP⁺, 10 mM, MgCl₂ · 6 H₂O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

- *Oxidace AaII potkaním jaterním mikrosomálním subcelulárním systémem:*
do inkubačních směsí bylo přidáno 411,2 μ l pufru, 11,5 μ l mikrosomů, 10 μ M AaII a nakonec 75 μ l NADPH-GS

Dané reagentie byly přidávány do inkubačních směsí v příslušném pořadí, jak je uvedeno výše. Inkubační směsi byly míchány a inkubovány po dobu 10 minut za stálého třepání (400 RPM, *Thermomixer Eppendorf compact*) při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 500 μ l ethylacetátu a pro lepší extrakci metabolitů AaII byly inkubační směsi 2 minuty intenzivně třepány (1 400 RPM, *Thermomixer Eppendorf compact*). Následně byla organická fáze oddělena centrifugací (13 000 RPM, 3 min., *centrifuga 5418, Eppendorf, úhlový rotor*). K vodné fázi bylo přidáno 1 ml ethylacetátu a byla provedena následná extrakce stejným způsobem. Spojené odebrané organické fáze byly odpařeny v digestoři (přes noc) a následně uchovány při teplotě -20 °C. Oxidace AaII a případný vznik jejich metabolitů byly analyzovány metodou RP-HPLC. Extrakty z jednotlivých inkubačních směsí byly před samotnou analýzou rozpuštěny v 30 μ l methanolu.

4.3.3.1 *Analýza metabolismu AAI prostřednictvím vysokotlakové (vysokoučinné) kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)*

Látky obsažené v inkubačních směsích byly analyzovány metodou RP-HPLC. Pro analýzu byla použita kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35 °C. Separace AAI a jejich metabolitů probíhala v gradientovém uspořádání o proměnném složení mobilní fáze ze 80 % A a 20 % B na konečné složení 40 % A a 60 % B. Mobilní fáze byly složeny ze směsi (A) 100 mM triethylaminacetát (TEAA; pH 7,0; úprava pH kyselinou octovou) a (B) 80 % acetonitrilu. Příslušné roztoky mobilních fází byly připraveny těsně před analýzou a filtrovány pro odstranění částic a plynů. Standardy AAI, AAI a AAIa byly připraveny přidáním 2 µl příslušného standardu k methanolu (celkový objem 30 µl). Na kolonu bylo vždy naneseno 20 µl vzorku o vhodné koncentraci a jedna eluce probíhala 55 minut při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. a při tlaku cca 80 bar. Inkubační směsi oxidace AAI a standardy byly analyzovány Systémem 1 HPLC (**kap. 4.2**). Separované látky obsažené v extraktech a samotné standardy byly detekovány při vlnové délce 250 nm.

4.3.4 Analýza AAI a jejich metabolitů v moči potkanů vystavených působení směsí AAI s AAI a samotnou AAI

Všechny experimenty sledující obsah AAI, AAI a jejich metabolitů v moči potkanů probíhaly v laboratoři Státního zdravotního ústavu v Praze a byly prováděny Dr. Jaroslavem Mrázem a Ing. Šárkou Duškovou. Potkaní modely byly vystaveny působení samotné AAI (1 mg) a směsí AAI s AAI (1 mg + 1mg). Z potkanů byla „sbíraná“ moč po 1. a 2. dni po vystavení a obsah AAI, AAI a jejich metabolitů v moči byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s HPLC (HPLC-MS) na tomto pracovišti.

4.3.5 Analýza aduktů DNA s AAI tvořených po redukční aktivaci tohoto toxikantu

Analýza aduktů s DNA vzniklých redukční aktivací AAI v tkáních potkaních modelů probíhala v Německém centru pro výzkum rakoviny (*Deutsches Krebsforschungszentrum*) v Heidelbergu. Experimenty byly prováděny školitelkou

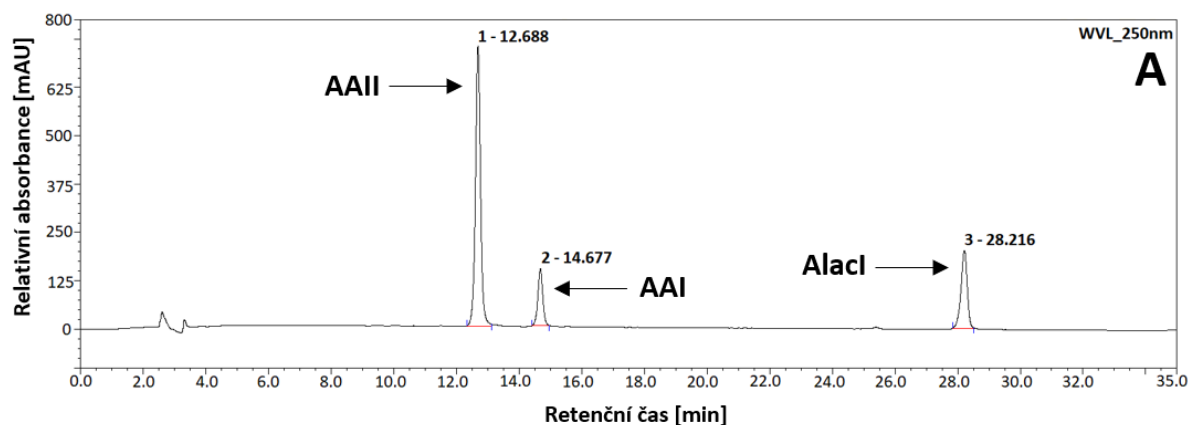
prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.. Adukty AAIL tvořené s DNA v játrech, ledvinách a plicích potkaních modelů vystavených působení této kyseliny (AAIL) *in vivo* a adukty, které byly tvořeny *in vitro*, redukční aktivací AAIL jaterními mikrosomy a cytosoly „kontrolních“ (nepremedikovaných) potkanů byly analyzovány metodou „³²P-postlabelling“ dle postupu popsaneho v dřívějších pracích^{130,133,134}.

5 Výsledky

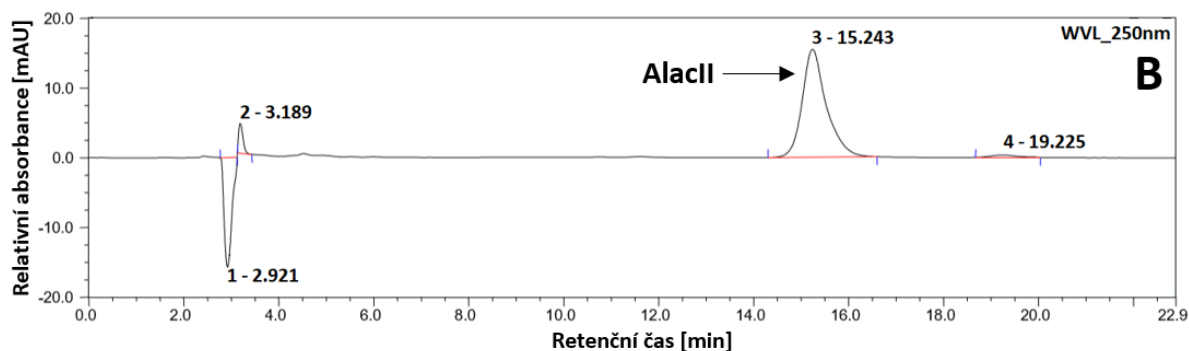
5.1 Redukce AAI jaterním cytosolárním a mikrosomálním subcelulárním systémem potkanů

Aristolochová kyselina II může v organismu podléhat redukční aktivaci vedoucí k vzniku metabolitu *N*-hydroxyaristolaktamu II (AlacII)^{60,64,65}. Daný metabolit se snadno rozpadá na vysoce reaktivní *N*-acylnitréniový ion, který interaguje zejména s purínovými bázemi za vzniku stabilních kovalentních aduktů s DNA. Tvorba redukčního metabolitu AlacII je vícezkroková, kdy vzniká řada meziproduktů, které jsou redukovány na zmínovaný finální metabolit AlacII nebo také mohou interagovat s DNA za vzniku aduktů^{36,66}.

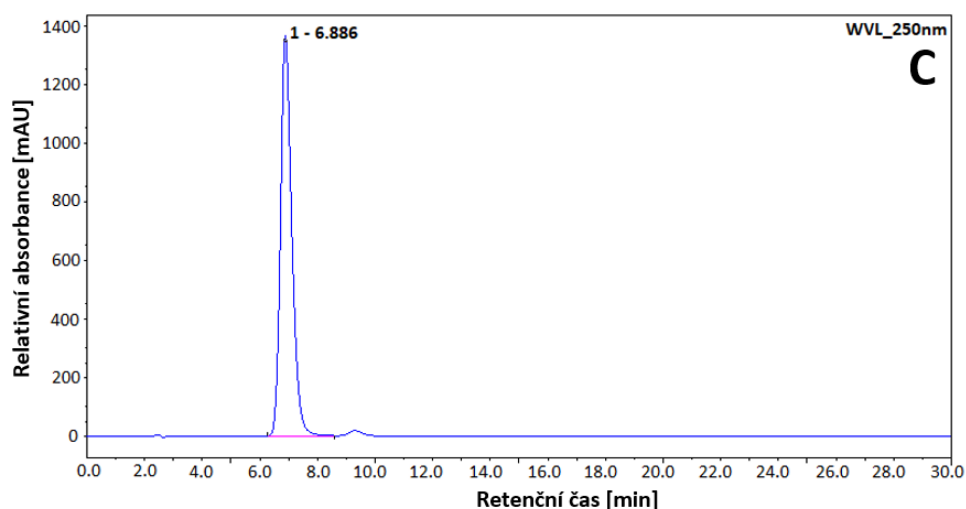
V experimentech byly jako standardy použity roztoky obou aristolochových kyselin AAI, AAI a jejich finálních metabolitů AlacI a AlacII. Standardy byly analyzovány pomocí RP-HPLC, detekce byla při 250 nm. Jak již bylo zmíněno (**kap. 4.3.2.1**), pro lepší rozlišení daných standardů byly využity dvě různá uspořádání eluce HPLC. Metodou 1 v gradientové eluci byly analyzovány standardy AAI, AAI a derivát AlacI, přičemž AAI byla detekována v retenčním čase 12,7 min, AAI byla detekována v retenčním čase 14,7 min a AlacI byl detekován v retenčním čase 28,2 min (**Obr. 15 A**). Metodou 2 při izokratické eluci byl analyzován derivát AlacII, který byl detekován v retenčním čase 15,2 min (**Obr. 15 B**) a také AAI s retenčním časem 6,9 min (**Obr. 15 C**).



Obr. 15: A) RP-HPLC standardů AAI, AAI a AlacI. Podmínky RP-HPLC (metoda 1): gradientová eluce, mobilní fáze (A) 100 mM TEAA (pH 7,0) a 20 % acetonitril, (B) 80 % acetonitril (100 % A a 0 % B → 40 % A a 60 % B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem CHROMELEONTM 6.01 integrator. Pík eluovaný v retenčním čase 12,7 min byl identifikován jako AAI, ve 14,7 min jako AAI a ve 28,2 min jako AlacI.



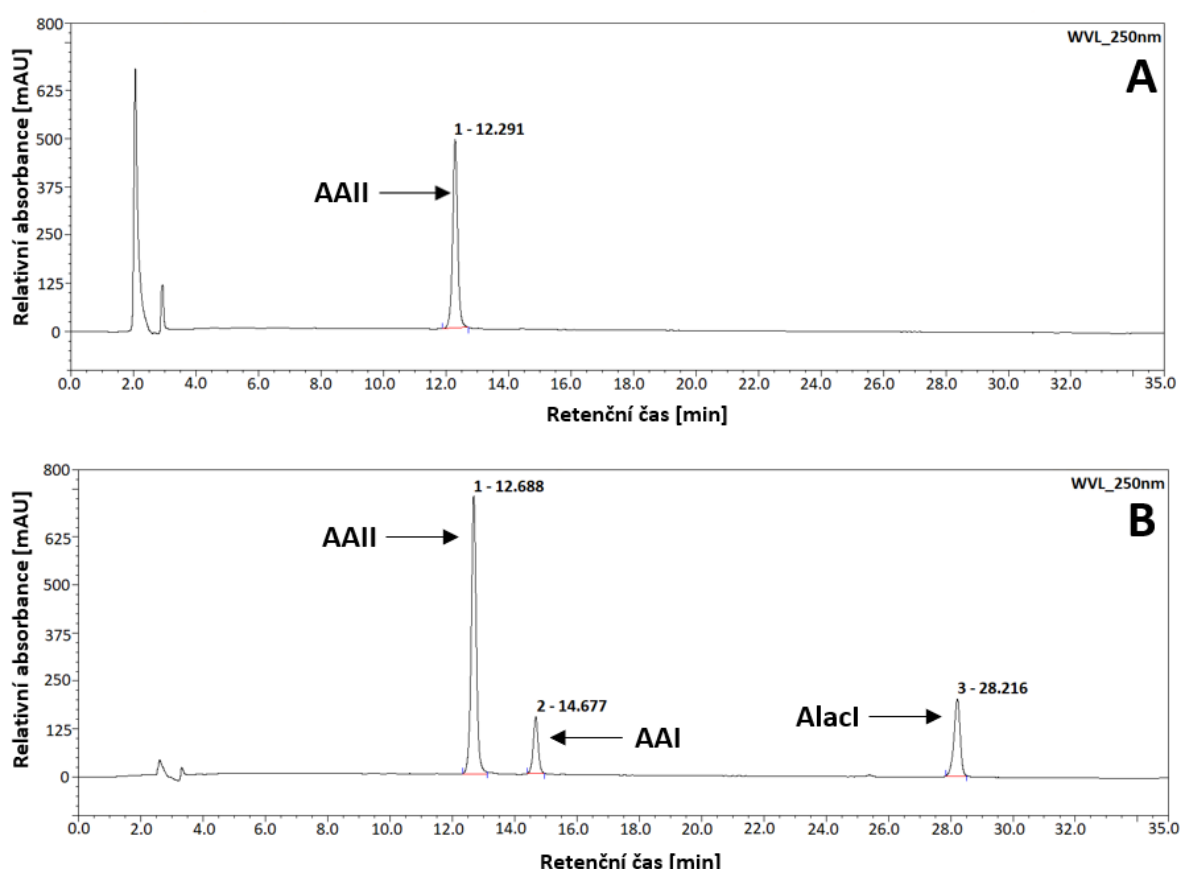
Obr. 15: B) RP-HPLC standardu *AlacII*. Podmínky RP-HPLC (metoda 2): izokratická eluce, mobilní fáze methanol, destilovaná voda a kyselina octová v poměru 65:34:1, průtok 1 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem CHROMELEON™ 6.01 integrator. Pík eluovaný v retenčním čase 15,2 min byl identifikován jako *AlacII* (str. 47, převzato a upraveno z ¹⁵).



Obr. 15: C) RP-HPLC standardu *AAlI*. Podmínky RP-HPLC (metoda 2): izokratická eluce, mobilní fáze methanol, destilovaná voda a kyselina octová v poměru 65:34:1, průtok 1 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem Agilent CemStation B.04.02. Pík eluovaný v retenčním čase 6,9 min byl identifikován jako *AlacII* (str. 47).

Tvorba metabolitu *AlacII* je katalyzována především cytosolárním enzymem NAD(P)H:chinon oxidoreduktasou (NQO1)^{70,134}. Pro studium redukční aktivity *AAlI* byly proto využity jaterní cytosolární systémy obsahující tento enzym (NQO1), a to cytosoly izolované z nepremedikovaného potkana. Redukční podmínky byly zabezpečeny aplikací argonu do inkubačních směsí. K cytosolům a roztoku *AAlI* byl přidán roztok NADPH jako kofaktor enzymu NQO1. Extrakce metabolitů *AAlI* byla provedena pomocí organického rozpouštědla ethylacetátu. Jednotlivé organické fáze byly centrifugací odděleny, odpařeny a před samotnou analýzou byly extrakty z inkubačních směsí rozpuštěny v methanolu.

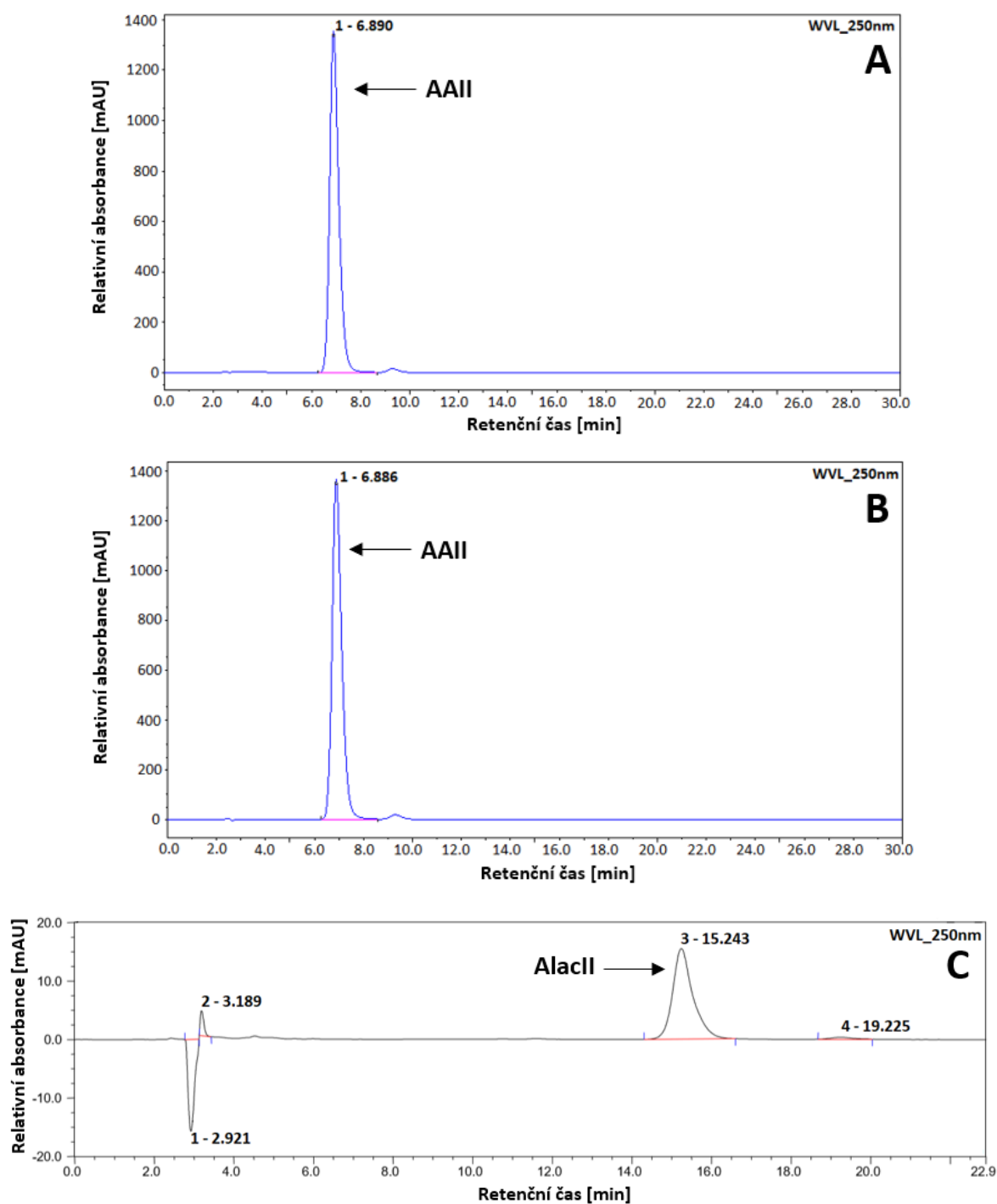
Analýza redukčních metabolitů AAIL byla realizována pomocí RP-HPLC metodou 1, t. j. v gradientovém uspořádání, detekce byla při 250 nm (**kap. 4.3.2.1**). Ve všech analyzovaných inkubačních směsích jsme zaznamenali pouze přítomnost AAIL a nikoliv jiné intermediáty nebo finální redukční metabolit AlacI. AAIL přítomná ve vzorcích byla detekována v retenčním čase 12,3 min (**Obr. 16 A**), odpovídající retenčnímu času standardu AAIL, 12,7 min (**Obr. 16 B**).



Obr. 16: RP-HPLC směsí sledující redukční aktivaci AAIL v cytosolárním systému izolovaného z nepremedikovaného potkana (A) ve srovnání s RP-HPLC standardů AAI, AAIL a AlacI (B). Podmínky RP-HPLC (metoda 1): gradientová eluce, mobilní fáze (A) 100 mM TEAA (pH 7,0) a 20 % acetonitril, (B) 80 % acetonitril (100 % A a 0 % B → 40 % A a 60 % B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vygenerován programem CHROMELEON™ 6.01 integrator.

A) Pík eluovaný v retenčním čase 12,3 min byl identifikován jako AAIL.

B) Pík eluovaný v retenčním čase 12,7 min byl identifikován jako AAIL, ve 14,7 min jako AAI a ve 28,2 min jako AlacI.



Obr. 17: RP-HPLC reakční směsi sledující redukční aktivaci AAI v cytosolárním systému izolovaného z nepremedikovaného potkana (**A**) ve srovnání s RP-HPLC standardu AAI (**B**) a standardu redukčního metabolitu AlacII (**C**). Podmínky RP-HPLC (metoda 2): izokratická eluce, mobilní fáze methanol, destilovaná vody a kyselina octová v poměře 65:34:1, průtok 1 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram standardu AAI a reakční směsi byl vytvořen programem Agilent CemStation B.04.02. Chromatogram standardu AlacII byl vytvořen programem CHROMELEON™ 6.01 integrator (*str. 51*).

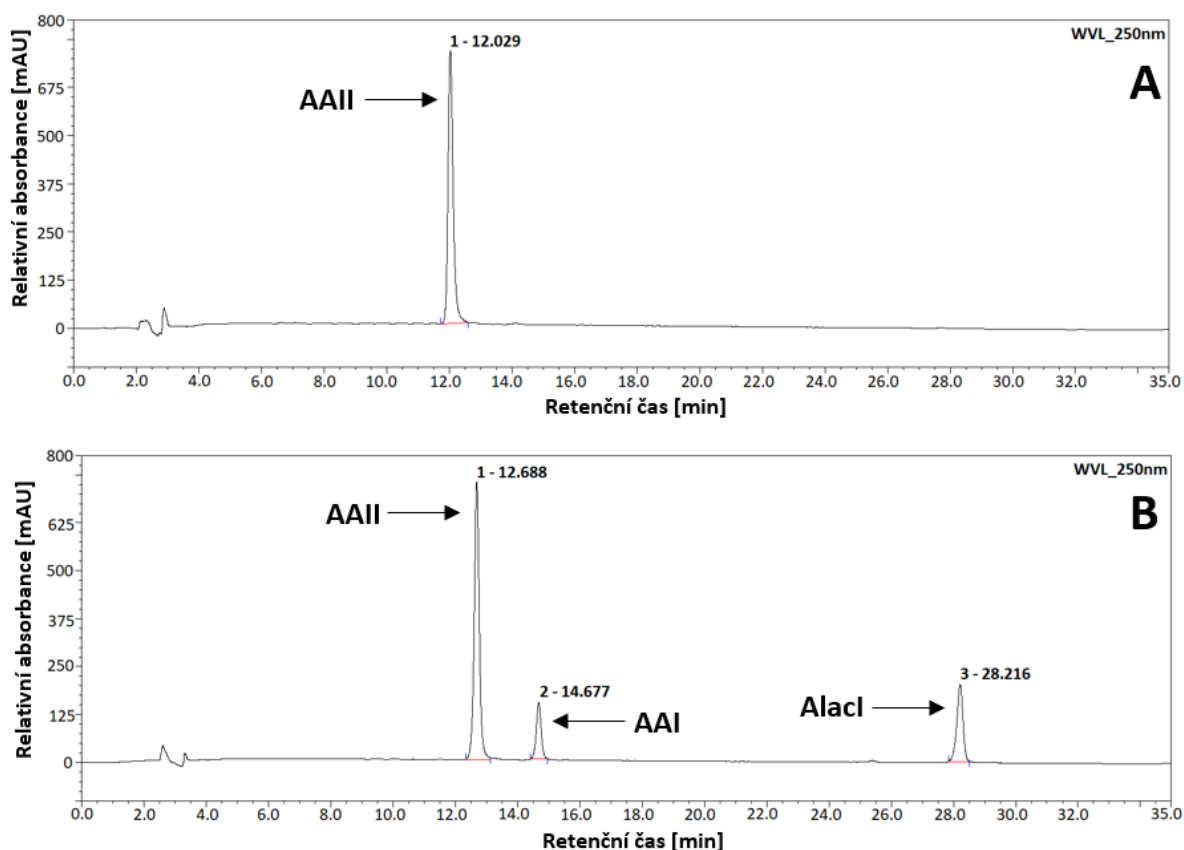
A) Pík eluovaný v retenčním čase 6,9 min byl identifikován jako AAI.

B) Pík eluovaný v retenčním čase 6,9 min byl identifikován jako AAI.

C) Pík eluovaný v retenčním čase 15,2 min byl identifikován jako AlacII.

Redukční metabolity AII byly analyzovány také prostřednictvím RP-HPLC v izokratickém uspořádání (metodou 2), detekce při 250 nm (**kap. 4.3.2.1**). V analyzovaných inkubačních směsích byla také detekována přítomnost AII, a žádné redukční intermediáty a ani finální metabolit AlacII. AII přítomná ve vzorcích byla detekována v retenčním čase 6,9 min (**Obr. 17 A**), což odpovídá retenčnímu času standardu AII, 6,9 min (**Obr. 17 B**). Retenční čas standardu AlacII je 15,2 min (**Obr. 17 C**).

AII může také podléhat redukční aktivaci i prostřednictvím enzymů lokalizovaných v membráně endoplasmatického retikula. Konkrétně se na redukci AII podílí mikrosomální CYP1A1/2^{67,69}. Kromě uvedených CYP, na redukci AII v mikrosomální frakci participuje i enzym NADPH:CYP reduktasa (POR)¹³⁵. Na základě toho byla redukční aktivace AII sledována nejen v jaterních cytosolárních systémech (**Obr. 16 A, 17 A**), ale také v jaterních mikrosomálních systémech izolovaných z nepremedikovaného potkana za stejných podmínek. Redukční deriváty AII byly analyzovány metodou 1 v gradientovém uspořádání RP-HPLC, detekce byla při 250 nm a metodou 2 v izokratickém uspořádání RP-HPLC, detekce byla při 250 nm (**kap. 4.3.2.1**). V inkubačních směsích jsme rovněž detekovali samotnou AII, ale nedetekovali jsme přítomnost žádných redukčních intermediátů ani finálního redukčního metabolitu AlacII. AII přítomná ve vzorcích byla detekována v retenčním čase 12,0 min (**Obr. 18 A**), odpovídající retenčnímu času standardu AII, 12,7 min (**Obr. 18 B**). Analýza redukčních derivátů AII byla také realizována metodou 2, t. j. v izokratickém uspořádání pomocí RP-HPLC, detekce byla při 250 nm (**kap. 4.3.2.1**). Vzhledem k tomu, že analýza potenciální redukce AII prováděná s mikrosomálním systémem byla analogická experimentům využívajícím jaterní cytosoly (**Obr. 17**), výsledky nejsou v předkládané diplomové práci uvedeny.



Obr. 18: RP-HPLC redukční směsi sledující aktivace AAI v mikrosomálním systému izolovaného z nepremedikovaného potkana (A) ve srovnání s RP-HPLC standardů AAI, AAI a AlacI (B). Podmínky RP-HPLC (metoda 1): gradientová eluce, mobilní fáze (A) 100 mM TEAA (pH 7,0) a 20 % acetonitril, (B) 80 % acetonitril (100 % A a 0 % B → 40 % A a 60 % B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem CHROMELEON™ 6.01 integrator (str. 51).

A) Pík eluovaný v retenčním čase 12,0 min byl identifikován jako AAI.

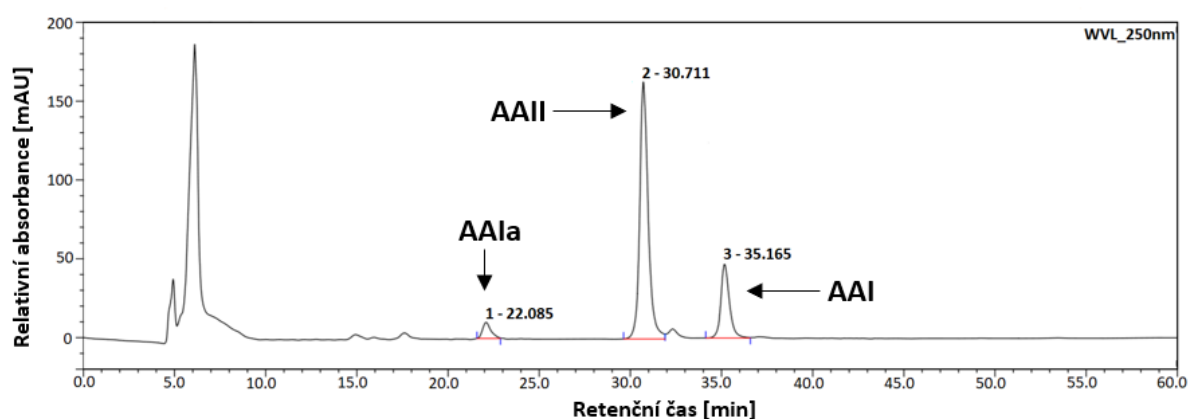
B) Pík eluovaný v retenčním čase 12,7 min byl identifikován jako AAI, ve 14,7 min jako AAI a ve 28,2 min jako AlacI.

I když je známo, že AAI ochotně podléhá aktivační redukci v experimentech *in vivo*, v experimentech *in vitro* jak s cytosolárním, tak s mikrosomálním systémem, jsme nezaznamenali tvorbu finálního redukčního metabolitu AAI (AlacII), ani jednotlivých redukčních intermediátů (Obr. 16 A, 17 A, 18 A). Pravděpodobným důvodem může být vznik vysoce reaktivních intermediátů interagujících s nukleofilními centry enzymů přítomných v jednotlivých subcelulárních frakcích. Dalším vysvětlením může být skutečnost, že redukční metabolity jsou tvořeny ve velmi nízkých koncentracích, které nejsou detekovatelné pomocí HPLC.

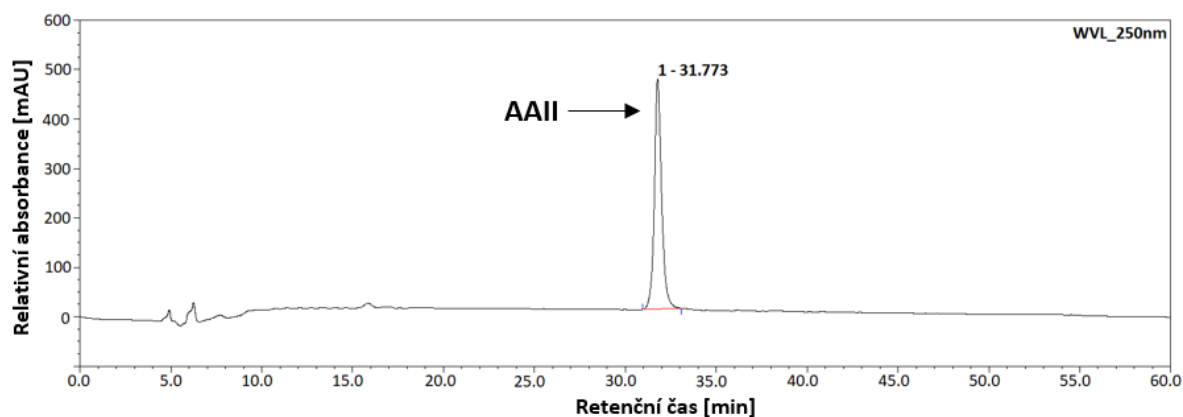
5.2 Oxidace AAI jaterním mikrosomálním subcelulárním systémem potkanů

Z dosavadních studií bylo předpokládáno, že AAI nepodléhá oxidační detoxikaci za vzniku oxidačního metabolitu AAIA (AAI hydroxylovaná v poloze 8), protože tato sloučenina tvořená přímou oxidací AAI dosud nebyla detekována, a to ani v lidských ani zvířecích modelech *in vivo*. Tento metabolit (AAIA) také nebyl detekován ani v experimentech *in vitro*^{64,80}.

V předkládané diplomové práci byly tyto výsledky, konkrétně v experimentech *in vitro*, potvrzeny. V experimentech byly jako standardy použity roztoky obou aristolochových kyselin AAI, AAI a oxidačního metabolitu AAIA, které byly analyzovány pomocí RP-HPLC v gradientovém uspořádání, detekce byla při 250 nm (**kap. 4.3.3.1**). Standard AAI byl detekován v retenčním čase 30,7 min, AAI byla eluována v retenčním čase 35,2 min a AAIA byla eluována v retenčním čase 22,1 min (**Obr. 19**).



Obr. 19: RP-HPLC standardů AAI, AAI a oxidačního derivátu AAIA. Podmínky RP-HPLC (metoda 1): gradientová eluce, mobilní fáze (A) 100 mM TEAA (pH 7,0) a (B) 80 % acetonitril (80 % A a 20 % B → 40 % A a 60 % B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem CHROMELEONTM 6.01 integrator. Pík eluovaný v retenčním čase 22,1 min byl identifikován jako AAIA, ve 30,7 min jako AAI a ve 35,2 min jako AAI.



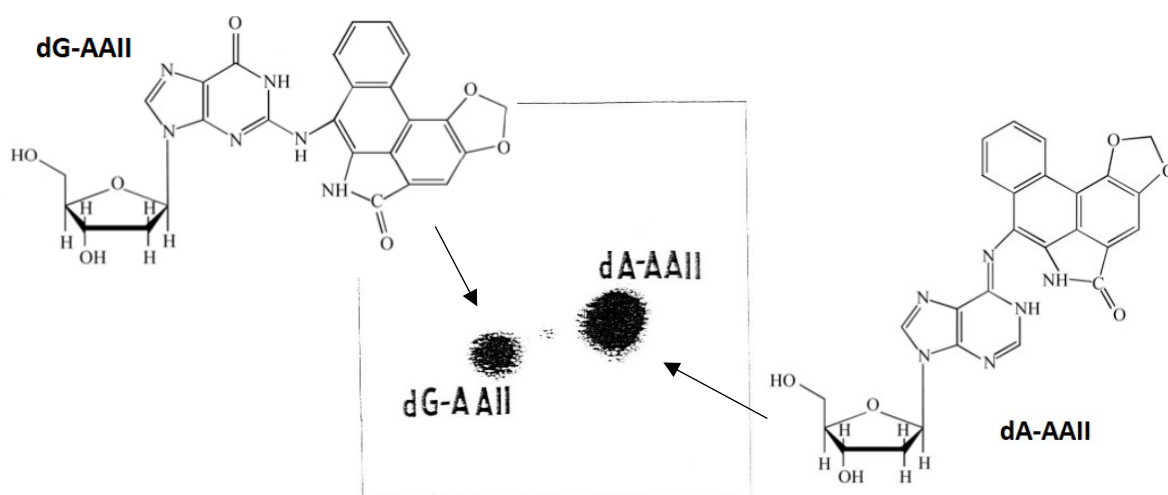
Obr. 20: : RP-HPLC reakční směsi sledující oxidační detoxikaci AII v mikrosomálním systému izolovaného z nepremedikovaného potkana potkana ve srovnání s RP-HPLC standardů AAI, AAI a oxidačního derivátu AAIa (**Obr. 19**). Podmínky RP-HPLC (metoda 1): gradientová eluce, mobilní fáze (A) 100 mM TEAA (pH 7,0) a (B) 80 % acetonitril (80 % A a 20 % B → 40 % A a 60 % B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 (Macherey-Nagel, SRN), teplota 35 °C, aplikováno 20 µl vzorku a detekce při 250 nm. Chromatogram byl vytvořen programem CHROMELEON™ 6.01 integrator. Pík eluovaný v retenčním čase 31,7 min byl identifikován jako AII (**Obr. 20**). Pík eluovaný v retenčním čase 22,1 min byl identifikován jako AAIa, ve 30,7 min jako AII a ve 35,2 min jako AAI (**Obr. 19**, str. 54).

CYP lokalizované v membráně endoplasmatického retikula se v závislosti na aerobním prostředí podílejí na oxidaci (za aerobních podmínek) nebo na redukci AAI (při anaerobním prostředí)¹³⁵. Na základě tohoto poznatku se předpokládá, že pomocí CYP by mohla být také zprostředkována oxidace AII. Proto byly pro studium oxidace AII použity jaterní mikrosomální systémy obsahující uvedené cytochromy P450. Jmenovitě byly použity mikrosomy izolované z jater nepremedikovaného potkana. Inkubační směsi obsahovaly mikrosomy, roztok AII a NADPH-generující systém. V analyzovaných inkubačních směsích byla detekována pouze AII. V tomto případě detekce samotné AII a ne její metabolitů potvrzuje, že AII nepodléhá oxidační detoxikaci na AAIa, jak je uvedeno výše, ani v presentovaných experimentech této diplomové práce. AII v analyzovaných inkubačních směsích byla detekována v retenčním čase 31,8 min (**Obr. 20**) odpovídající retenčnímu času standardu AII, 30,7 min (**Obr. 19**).

5.3 Tvorba aduktů AII s DNA v experimentech in vitro

Po reakci AII probíhající v jaterních mikrosomech a cytosolech za anaerobních podmínek (Ar) bylo sledováno, zda se tvoří adukty AII s DNA. Použité subcelulární systémy byly izolovány z potkanů bez premedikace (tzv. „kontrolní“ potkani).

Při inkubaci AII s DNA, oběma typy zmíněných subcelulárních systémů a NADPH (jako kofaktoru NADPH-dependentní reakce katalyzované CYP a POR), byly tvořeny dva adukty s DNA, a to dA-AII a dG-AII (**Obr. 21, Tab. 2**). V inkubačních směsi bez přidaného NADPH nebyly adukty AII s DNA detekovány (výsledky nejsou uvedeny). Uvedené výsledky signalizují, že AII je redukčně aktivována jak enzymy mikrosomálními (CYP, POR), tak i enzymy cytosolárními (NQO1, xanthinoxidasa), u kterých bylo již v dřívějších studiích zjištěno, že redukují tento toxikant⁶⁷⁻⁷⁰.



Obr. 21: Autoradiogram aduktů AII s DNA tvořených v jaterních mikrosomech a cytosolech izolovaných z nepremedikovaných potkanů (metoda „³²P-postlabelling“).

Množství tvořených aduktů AII s DNA bylo vyšší po její aktivaci enzymy mikrosomálních subcelulárních systémů (0,5 mg proteinů mikrosomů) než enzymy systému cytosolů (0,5 mg proteinů cytosolů, **Tab. 2**).

Tabulka 2: Tvorba aduktů AAI s DNA v *in vitro* experimentech v jaterních mikrosomech a cytosolech izolovaných z „kontrolních“ (nepremedikovaných) potkanů

Mikrosomální systém (MS)		RAL ^a /10 ⁸			
	<i>dG-AAI</i>	<i>dG-AAII</i>	<i>dA-AAI</i>	<i>dA-AAII</i>	Celkové mn. ^{**}
MS + AAI	ND*	0.17 ± 0.02	ND*	0.66 ± 0.70	0.83 ± 0.71

Cytosolární systém (CYT)		RAL ^a /10 ⁸			
	<i>dG-AAI</i>	<i>dG-AAII</i>	<i>dA-AAI</i>	<i>dA-AAII</i>	Celkové mn. ^{**}
CYT+ AAI	ND*	0.15 ± 0.02	ND*	0.35 ± 0.40	0.50 ± 0.06

Poznámky:

RAL – z angl. „relative adduct labeling“, poměr počtu vzniklých aduktů vůči celkovému množství volných nemodifikovaných nukleotidů

Celkové mn.^{}** – celkové množství aduktů s DNA

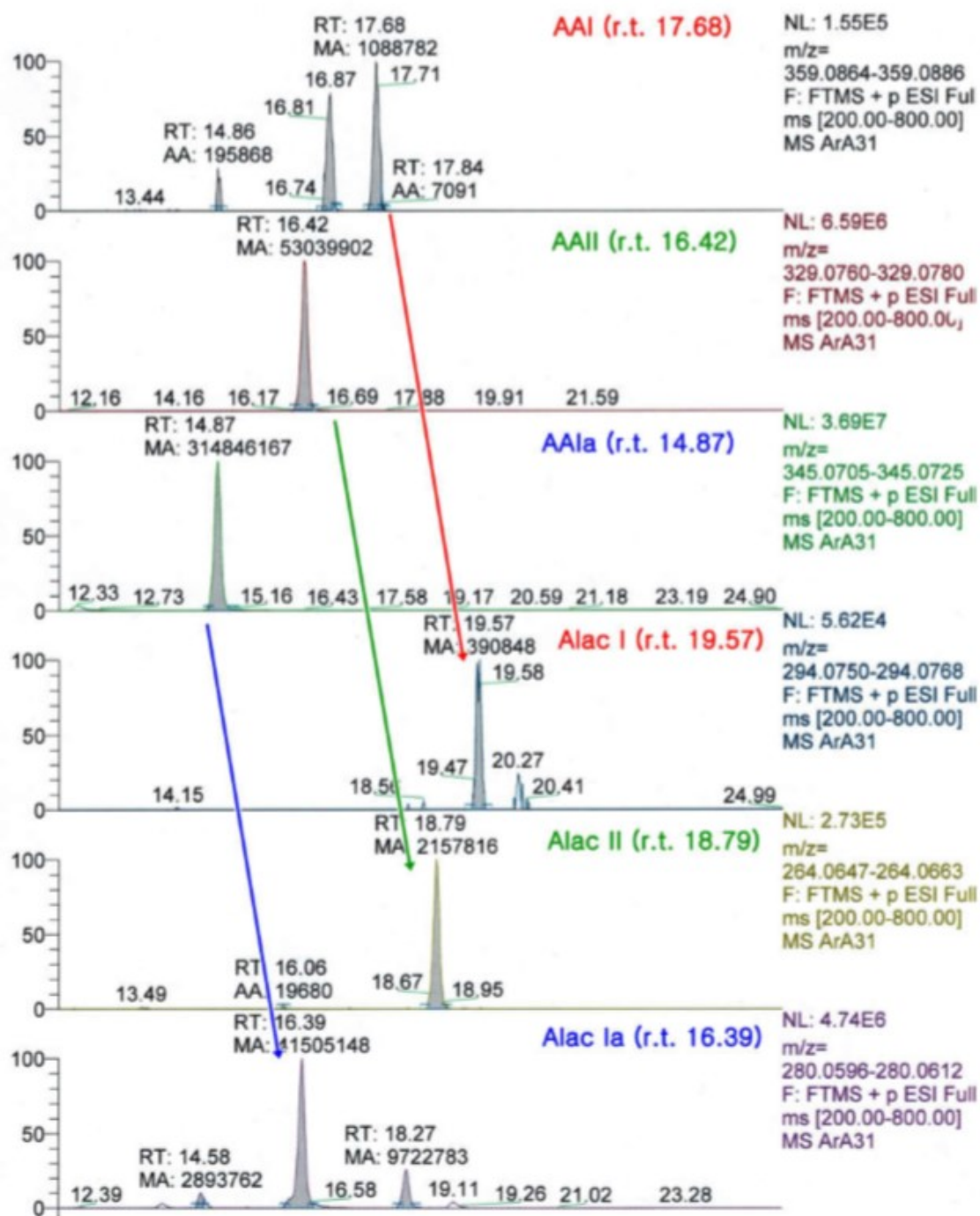
ND* – nedetekováno

Adukty AA s DNA – *dG-AAI* a *dG-AAII*
– *dA-AAI* a *dA-AAII*

5.4 Analýza metabolitů AAI v moči potkanů premedikovaných směsí AAI s AAI a samotnou AAI

Přítomnost tvorby metabolitů tvořených jak redukční, tak oxidační cestou byla analyzována i v podmínkách *in vivo*, a to konkrétně v moči potkanů, kteří byli vystaveni působení směsí obou kyselin, AAI s AAI, a samotné AAI. Moč z potkaních modelů byl „sbírána“ po 1. a 2. dni po vystavení zvířat a analyzována pomocí HPLC a hmotnostní spektrometrie (**kap. 4.3.4**).

Jak bylo zmíněno již výše, AAI podléhá redukci a jako hlavní metabolit této redukční cesty vzniká AlacII^{60,64,65}. Z dřívějších studií bylo rovněž zjištěno, že při použitém experimentálním přístupu *in vivo* vzniká z AAI i derivát AlacIa⁸¹. Proto jsme se v našich experimentech zaměřili na analýzu uvedených metabolitů.

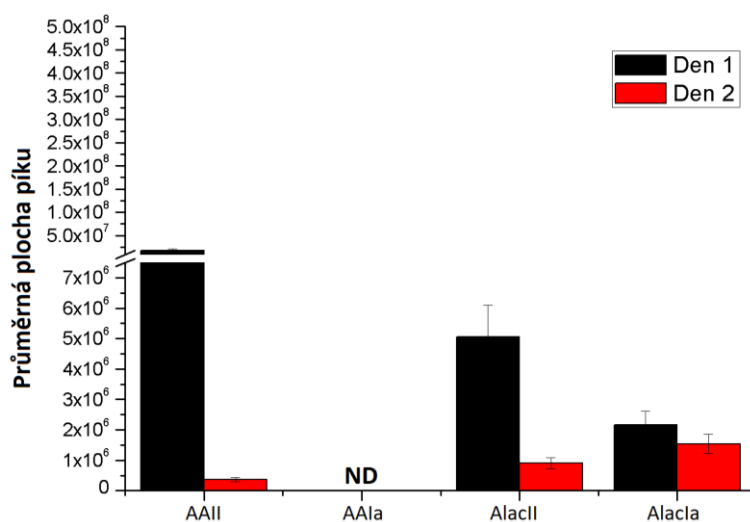


Obr. 22: Oxidační a redukční metabolity kyselin AAI a AAI separovaných pomocí HPLC a dále analyzovaných prostřednictvím hmotnostní spektrometrie (str. 57 a 58).

Metabolity tvořené oxidací nebo redukcí AAI a AAI přítomné v moči potkanů byly separovány pomocí HPLC a dále analyzovány prostřednictvím hmotnostní spektrometrie (**Obr. 22**). Hodnoty ploch pík aristolochových kyselin a jejich jednotlivých metabolitů uvedených na **Obr. 22** byly následně kvantifikovány a množství tvořených metabolitů je

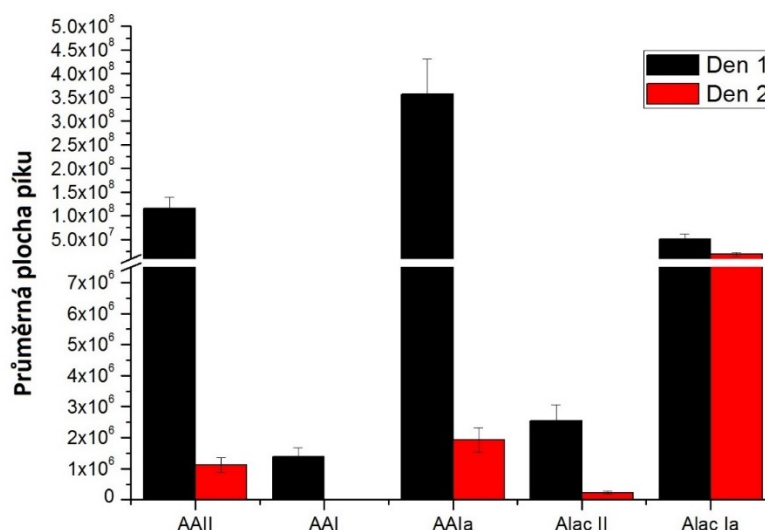
znázorněno ve sloupcových grafech (**Obr. 23 a 24**). Hmotnostní spektra poukazují na vzájemné souvislosti mezi jednotlivými analyzovanými deriváty. AAI může být redukována na metabolit AlacI nebo oxidována na derivát AAIIa. Kromě tohoto, derivát AAIIa může být dále přeměňován na AlacIIa, a to redukcí jeho nitro skupiny. AAII je redukována na svůj redukční metabolit AlacII (**Obr. 22**)⁶⁹.

V moči potkanů premedikovaných samotnou AAII byl identifikován jako hlavní metabolit její redukční dráhy, AlacII. Derivát AAIIa vzniká pouze oxidací AAI a jeho přítomnost jsme v moči potkanů proto nedetekovali (**Obr. 23**)¹³⁶. Dále byl z metabolitů AAII v moči identifikován také derivát AlacIIa, jehož tvorba však dosud není plně osvětlena. Nicméně, jelikož AlacIIa nevzniká přímou redukcí AAIIa, protože ten z AAII nevzniká, vznik AlacIIa lze tedy vysvětlit jinými reakcemi, např. přeměnou derivátu AlacII, jeho oxidací na uhlíku 8 (**Obr. 23**). Po prvním dni od premedikace potkanů samotnou AAII, je tato kyselina přednostně redukována na hlavní redukční metabolit AlacII, který může být dále hydroxylován na AlacIIa⁶⁰. Po druhém dni po vystavení zvířat mírně klesá množství derivátu AlacIIa a významně ubývá množství metabolitu AlacII. Dané změny v množstvích jednotlivých derivátů tedy potvrzují předpoklad, že redukční metabolit AAII (AlacII) je dále přeměňován na výše zmíněný AlacIIa. Také klesající množství AAII v průběhu dvou dnů signalizuje, že AAII je v organismu potkaního modelu metabolizována na příslušné metabolity (**Obr. 23**).



Obr. 23: Analýza přítomnosti AAII a jejích redukčních a oxidačních derivátů v moči potkanů premedikovaných AAII. Sloupce udávají množství samotné AAII a vzniklých metabolitů. Moč z premedikovaných potkanů byla odebrána po 1. a 2. dni po vystavení působení AAII.

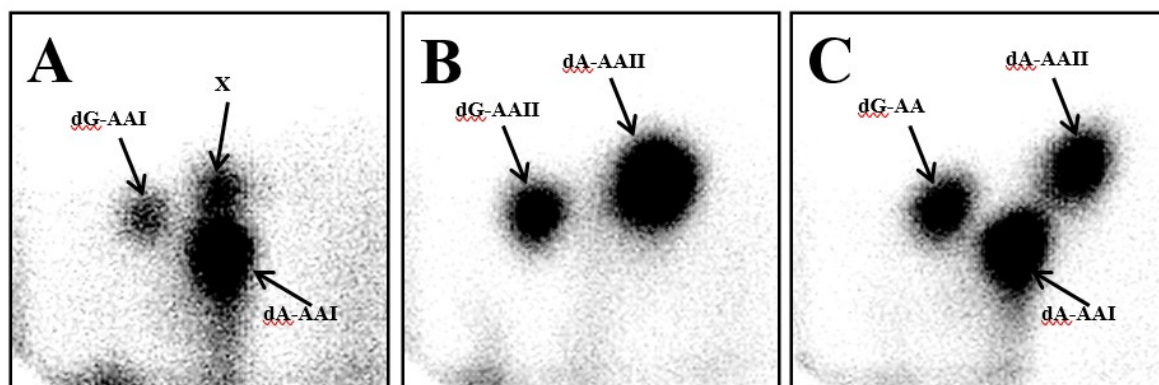
Dále jsme se zaměřili na analýzu redukčních a oxidačních metabolitů v moči potkanů vystavených působení směsí kyselin AAI s AAIL. Dle dřívějších studií je známo, že AAI je redukována na AlacI, ale ochotněji oxidována na derivát AAIA, který může být následně redukována na AlacIa^{136,137}. AAIL je redukována na hlavní metabolit AlacII^{60,64,65}. Na základě uvedených studií jsme se proto zaměřili na analýzu těchto derivátů. V experimentech prováděných v rámci diplomové práce byl v moči potkanů v největší míře identifikován jako hlavní oxidační metabolit AAIA, který vzniká pouze oxidací AAI (**Obr. 24**) a nevzniká z AAIL (**Obr. 23**)¹³⁶. Také byla identifikována tvorba derivátu AlacIa, který může vznikat redukcí AAIA tvořené demethylací AAI přítomné ve směsi¹³⁸. Množství derivátu AAIA signalizuje, že AAI je přednostně oxidována a později může dojít k její redukci na výše zmíněný derivát AlacIa. Nicméně, zdrojem derivátu AlacIa může být, jak již bylo dříve uvedeno, AAIL přítomná ve směsi, která je redukována na AlacII. AlacII dále pravděpodobně podléhá oxidaci za vzniku daného AlacIa. Na základě množství vzniklého derivátu AlacIa v potkanech premedikovaných směsí obou kyselin lze tedy předpokládat, že daný derivát je společným koncovým metabolitem redukční dráhy AAI a AAIL, protože jeho množství je výrazně vyšší po prvním i druhém dni od premedikace⁶⁰. I v tomto případě klesající množství obou kyselin poukazuje na fakt, že AAI i AAIL jsou v organizmech metabolizovány za vzniku jednotlivých detekovaných derivátů (**Obr. 24**).



Obr. 24: Analýza přítomnosti AAI, AAIL a jejich redukčních a oxidačních derivátů v moči potkanů premedikovaných směsí AAI s AAIL. Sloupce udávají množství samotné AAIL a vzniklých metabolitů. Moč z premedikovaných potkanů byla odebrána po 1. a 2. dni po vystavení působení směsi AAI s AAIL.

5.5 Tvorba aduktů AAI a AAI s DNA v potkaních modelech in vivo

Tvorba jednotlivých aduktů AAI s DNA (rovněž jako aduktů AAI s DNA) byla sledována v játrech, ledvinách a plicích laboratorních potkanů vystavených působení AAI, AAI a směsí obou kyselin AAI s AAI. Adukty s DNA ve zmíněných orgánech byly nalezeny po působení jak samotných kyselin AAI a AAI, tak i v jejich směsi (2 dny po premedikaci). AAI, AAI a jejich směs generovala v námi testovaných modelech laboratorního potkana až čtyři různé adukty (dG-AAI, dA-AAI, dG-AAI a dA-AAI). V případě ledvin byl detekován i další adukt, jehož struktura však dosud nebyla určena (adukt X v **Obr. 25**).



Obr. 25: Autoradiogram aduktů AA s DNA v ledvinách laboratorních potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí obou kyselin (metoda „ ^{32}P -postlabelling“). Autoradiogram aduktů AAI s DNA (A), aduktů AAI s DNA (B), aduktů směsí obou kyselin s DNA (C).

Po premedikaci potkanů samotnou AAI a AAI, generují tyto látky stejná množství aduktů s DNA v játrech. Avšak AAI byla méně efektivní ve tvorbě aduktů s DNA v ledvinách a plicích v porovnání s AAI (**Tab. 3**). Největší množství aduktů aristolochových kyselin s DNA bylo v rámci všech třech orgánů tvořeno v ledvinách testovaných zvířat. V případě laboratorních potkanů vystavených směsí obou aristolochových kyselin, docházelo ke zvýšení celkového množství aduktů ve všech orgánech – 2.4krát v játrech, 1.7krát v ledvinách a 2.7krát v plicích (**Tab. 3**). Daná skutečnost naznačuje potenciaci aktivačních reakcí aristolochových kyselin působením směsi obou těchto sloučenin. Důležitým poznatkem je fakt, že po působení směsi obou kyselin, AAI s AAI, signifikantně narůstá množství aduktu AAI s DNA, aduktu dA-AAI (až 4.5krát v ledvinách, **Tab. 3**). Dle dřívějších studií je známo, že daný adukt dA-AAI hraje

esenciální úlohu ve vývoji nádorových procesů v organizmech. Je zodpovědný za dlouhodobě fixovanou AT → TA transverzní mutaci v tumor-supresorovém genu *p53*^{142,143}. Expozice organismů včetně člověka směsi obou aristolochových kyselin AAI i AAII je tak fatální pro vývoj nádorů.

Tabulka 3: Tvorba aduktů AAI a AAII s DNA v játrech, ledvinách a plicích potkanů vystavených působení AAI, AAII a směsi obou kyselin *in vivo*

<i>RAL (10⁻⁸/normální nukleotidy)</i>		
<i>Játra</i>	<i>Celkové mn.**</i>	<i>dA-AAI</i>
AAI	20.4 ± 0.7	16.1 ± 0.8
AAII	20.6 ± 4.7	ND*
AAI + AAII	99.4 ± 27.3	58.2 ± 17.3
<i>Ledviny</i>	<i>Celkové mn.**</i>	<i>dA-AAI</i>
AAI	47.8 ± 16.8	33.7 ± 10.6
AAII	133.5 ± 29.2	ND*
AAI + AAII	307.0 ± 89.8	153.5 ± 49.2
<i>Plíce</i>	<i>Celkové mn.**</i>	<i>dA-AAI</i>
AAI	8.5 ± 1.6	6.8 ± 1.1
AAII	18.3 ± 5.8	ND*
AAI + AAII	71.6 ± 16.4	30.2 ± 7.7

Poznámky:

RAL – z angl. „relative adduct labeling“, poměr počtu vzniklých aduktů vůči celkovému množství volných nemodifikovaných nukleotidů

Celkové mn.** – celkové množství aduktů AAI a AAII s DNA

ND* – nedetekováno

Adukt AAI s DNA – *dA-AAI*

6 Diskuze

Předkládaná diplomová práce byla zaměřená na studium metabolismu karcinogenní a nefrotoxické látky AAI jak redukční aktivaci, tak i její detoxikaci. Metabolizmus AAI byl sledován v experimentech *in vitro* a také ve zvířecích (potkaních) modelech *in vivo*.

První přístup studia biotransformace AAI byl založen na experimentu *in vitro*, konkrétně na redukci uvedené kyseliny jaterním cytosolárním a mikrosomálním subcelulárním systémem izolovaným z tzv. „kontrolních“ (tedy nepremedikovaných) potkanů. Jak již bylo výše zmíněno, na redukční aktivaci AAI participují jak cytosolární enzymy (NQO1, xanthinoxidasa), tak i mikrosomální enzymy (CYP, POR)^{67,68,70,134,135}. Za finální metabolit v redukční dráze této kyseliny se považuje AlacII. Ten vzniká z *N*-hydroxyaristolaktamu II. Tento reaktivní metabolit se však i snadno rozpadá na *N*-acylnitréniový kation interagující s DNA za vzniku kovalentních aduktů^{36,60,64-66}. Pro optimalizaci experimentů prováděných v rámci diplomové práce byly použity dvě různá uspořádání RP-HPLC¹³². Analýza metabolismu AAI pomocí HPLC probíhala metodou 1 v gradientovém uspořádání o proměnném složení mobilní fáze a metodou 2 v izokratickém uspořádání. Ve všech inkubačních směsích (jak v cytosolárním, tak mikrosomálním systému) analyzovaných oběma metodami eluce sloučenin při HPLC byla detekována pouze přítomnost samotné AAI. Ani v jednom vzorku jsme nezaznamenali tvorbu finálního redukčního metabolitu AlacII a ani žádných jiných redukčních metabolitů AAI. Toto zjištění lze vysvětlit alespoň dvěma způsoby: (i) v průběhu redukce AAI vznikají vysoce reaktivní intermediáty, které mohou interagovat s nukleofilními centry enzymů přítomných v uvedených subcelulárních systémech a nejsou tedy detekovatelné HPLC a (ii) vzniklé redukční metabolity jsou tvořeny v tak nízkých množstvích, že nejsou detekovatelné HPLC.

I když se z dosavadních studií předpokládalo, že uvedená kyselina nepodléhá přímé oxidaci^{64,80}, současně s redukční aktivací AAI byla v předkládané práci sledována také její oxidační detoxikace. Pro experimenty sledující oxidaci AAI jsme použili jaterní mikrosomální subcelulární systémy izolované z nepremedikovaných potkanů. Domnívali jsme se, že participace CYP na metabolismu AAI a její aktivita závislá od prostředí (aerobní prostředí oxidace AAI, anaerobní prostředí redukce AAI)¹³⁵, by mohla být podobná i v případě oxidační detoxikace AAI. Proto byly použity mikrosomální systémy. Možným oxidačním metabolitem AAI by mohla být AAIa, vznikající hydroxylací AAI na uhlíku 8. I v tomto přístupu byla v inkubačních směsích výhradně detekována přítomnost AAI a nebyly detekovány žádné oxidační deriváty AAI, tedy ani metabolit AAIa. Dle uvedených

presentovaných experimentů můžeme tedy potvrdit, že AAI není oxidována na oxidační metabolit AAIIa.

Třetím přístupem studia metabolismu AAI založeným na experimentech *in vitro* byla analýza tvorby aduktů této kyseliny s DNA v jaterních mikrosomech a cytosolech izolovaných z tzv. „kontrolních“ potkanů. V inkubačních směsích s přidaným NADPH jako kofaktorem NADPH-dependentních reakcí katalyzovaných jak mikrosomálními (POR, CYP), tak cytosolárními enzymy (NQO1) jsme detekovali přítomnost dvou aduktů AAI s DNA, a to 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II (dA-AAII) a 7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam II (dG-AAII). Naopak v inkubačních směsích bez přidaného NADPH se netvořil žádný adukt. Uvedené výsledky potvrzují participaci enzymů obou subcelulárních systémů na redukční aktivaci AAI, ovšem za nutné přítomnosti kofaktoru NADPH. Vyšší množství tvořených aduktů AAI s DNA v mikrosomech ve srovnání v cytosolárním systémem signalizuje, že AAI je ve vyšší míře redukčně aktivována mikrosomálním systémem za současného vzniku uvedených aduktů.

Kromě pohledu na biotransformaci AAI v experimentech *in vitro*, dalším přístupem v předkládané diplomové práci byla analýza metabolitů AAI v potkaních modelech *in vivo*. Tvorba metabolitů AAI byla analyzována v moči potkanů vystavených působení samotné AAI a směsí obou AA, která byla „sbírána“ po 1. a 2. dni od vystavení. Metabolity vzniklé biotransformací AAI a AAI byly separovány HPLC a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS). V případě analýzy metabolitů AAI v moči potkanů premedikovaných samotnou AAI, byla potvrzena tvorba finálního metabolitu redukční dráhy AAI (AlacII). Tvorba derivátu AAIIa nebyla v moči detekována, což jsme očekávali; uvedený derivát vzniká výhradně oxidací AAI. Z dřívějších studií v experimentech *in vivo* byla zjištěná tvorba derivátu AlacIa z AAI⁸¹. V předkládané práci byla tvorba AlacIa potvrzena, avšak její mechanismus dosud není plně osvětlen. Uvedený derivát pravděpodobně vzniká oxidací na uhlíku 8 redukčního metabolitu AlacII, jelikož AlacIa nemůže vznikat redukcí AAIIa. Ta není tvořená z AAI. Předpoklad přeměny metabolitu AlacII na derivát AlacIa potvrzují i změny v jejich množstvích v moči po 1. a 2. dni od premedikace potkaních modelů samotnou AAI. V případě potkanů vystavených směsí obou kyselin AAI s AAI, byla také potvrzena přítomnost finálního redukčního metabolitu AlacII. Detekce AAIIa v moči potkanů premedikovaných směsí obou AA signalizuje, že vzniká z AAI přítomné ve směsi. Derivát AAIIa může být dále redukován na AlacIa čímž přispívá k celkovému množství uvedeného derivátu (AlacIa) vzniklého jak redukční dráhou AAIIa,

tak také redukční dráhou AAII přítomné ve směsi. Na základě uvedeného faktu můžeme předpokládat, že společným koncovým metabolitem v redukční dráze obou kyselin je tedy intermediát AlacIa.

Posledním přístupem studia metabolismu AAII byla analýza tvorby aduktů AAI a AAII s DNA v potkaních modelech *in vivo*. Potkani byli opět vystaveni působení samotné AAI, AAII a směsi obou kyselin a tvorba aduktů byla sledována v játrech, plicích a ledvinách. Ve všech uvedených orgánech jsme detekovali čtyři různé adukty, jejichž tvorba je známa z dřívějších studií^{70,72}. Jedná se o adukty 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl) aristolaktam I a II (dA-AAI a dA-AAII) a 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl) aristolaktam I a II (dG-AAI a dA-AAII). Kromě výše uvedených aduktů AA s DNA jsme v ledvinách detekovali i adukt s dosud neznámou strukturou, označený v **Obr. 25** písmenem X. V játrech premedikovaných potkaních modelů samotnými AAI a AAII, obě kyseliny tvoří stejná množství aduktů, ale zajímavým zjištěním bylo, že AAII je efektivnější v tvorbě aduktů s DNA ve dvou dalších orgánech uvedených výše. Na základě celkového množství tvořených aduktů AA s DNA ve všech třech testovaných orgánech můžeme předpokládat, že ledviny jsou pravděpodobně primárním cílem působení AA, protože míra tvorby uvedených aduktů je v tomto orgánu výrazně vyšší. U potkanů vystavených směsí obou kyselin jsme zaznamenali zvýšení celkového množství aduktů v jednotlivých orgánech, což signalizuje potenciaci aktivačních reakcí v biotransformaci obou kyselin. Klíčovým poznatkem je signifikantní nárůst množství aduktu dA-AAI v důsledku působení obou kyselin, AAI s AAII, v potkaních modelech. Uvedený adukt způsobuje transverzní mutaci AT → TA v genu *p53* známou již z dřívějších studií^{36,69,102}, a proto daný fakt nárůstu výše uvedeného aduktu poukazuje na fatální vliv AA ve vývoji nádorů v důsledku expozice organismů směsí obou AA.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce byla zaměřená na objasnění metabolismu aristolochové kyseliny II (AAII). Ke studiu této kyseliny byl využit jak experimentální přístup *in vitro*, tak i *in vivo*. Cíle diplomové práce byly splněny:

- 1) AAII podléhá redukční aktivaci vedoucí ke vzniku finálního redukčního metabolitu AlacII. Uvedený metabolit byl detekován pouze v experimentech *in vivo*. Dále byl detekován metabolit aristolaktam Ia (AlacIa), který pravděpodobně vzniká hydroxylací AlacII na uhlíku 8.
- 2) Bylo potvrzeno, že AAII nepodléhá oxidační detoxikaci, protože ani v jednom experimentálním přístupu (*in vitro* i *in vivo*) nebyly detekovány žádné přímé oxidační metabolity AAII.
- 3) V průběhu redukční aktivace AAII u obou přístupů, *in vitro* i *in vivo*, byla prokázána tvorba aduktů AAII s DNA, a to 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktamu II (dA-AAII) a 7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktamu II (dG-AAII). Kromě toho, AAII je ve srovnání s AAI efektivnější v tvorbě aduktů s DNA v ledvinách a plicích potkanů premedikovaných směsí obou aristolochových kyselin.
- 4) Premedikace potkanů směsí AAI s AAII potencuje tvorbu aduktu 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktamu I (dA-AAI), který je klíčový v iniciaci nádorových procesů vyvolaných AAI.

Seznam použité literatury

- (1) Ruddon, R.W.: Cancer Biology. Oxford University Press, New York, New York (2007)
- (2) Knowles, M.A., Selby, P.J.: Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, New York, United States (2005)
- (3) Pecorino, L.: Molecular Biology of Cancer. Mechanism, Targets and Therapeutics. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom (2012)
- (4) Bachar, G., Raiter, A., Gilat, H., Feinmesser, R., Hardy, B.: Head Neck Oncology 6, 15 (2014)
- (5) Joyce, J.A., Pollard, J.W.: Nat. Rev. Cancer 9, 239-252 (2009)
- (6) Lee, S.Y., Ju, M.K., Jeon, H.M., Lee, Y.J., Kim, C.H., Park, H.G., Han, S.I., Kang, H.S.: Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 1027453 (2018)
- (7) Psaila, B., Lyden, D.: Nat. Rev. Cancer 9, 285-293 (2009)
- (8) López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M.J., Galluzzi, L.: Cancer Cell 32, 135-154 (2017)
- (9) De Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M: Nat. Rev. Cancer 6, 24-37 (2006)
- (10) Karki, J., Man, S.M., Kanneganti, T.D.: Cancer Immunol. Res. 5, 94-99 (2017)
- (11) Moriya, J., Minamino, T.: Front. Cardiovasc. Med. 4, 65 (2017)
- (12) Hanahan, D., Weinberg, R.A.: Cell 144, 646-674 (2011)
- (13) Pelengaris, S., Khan, M.: The Molecular Biology of Cancer. Blackwell Publishing, Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom (2006)
- (14) Pitot, H.C.: Cancer 72, 962-970 (1993)
- (15) Hofseth, L.J., Weston, A., Harris, C.C.: Chemical Carcinogenesis, v knihe Cancer Medicine (Holland, J.F., Frei, E. ed.) BC Decker, Ontario, Canada, str. 287-306 (2003)
- (16) Theodoratou, E., Timofeeva, M., Li, X., Meng, X., Ioannidis, J.P.A.: Annu. Rev. Nutr. 37, 293-320 (2017)
- (17) Dzutsev, A., Goldszmid, R.S., Viaud, S., Zitvogel, L., Trinchieri, G.: Eur. J. Immunol. 45, 17-31 (2015)

- (18) Clapp, R.W., Jacobs, M.M., Loechler, E.L.: Rev. Environ. Health 23, 1-37 (2008)
- (19) Falzone, L., Marconi, A., Loreto, C., Franco, S., Spandido, D.A., Libra, M.: Mol. Med. Rep. 14, 4467-4474 (2016)
- (20) Park, B., Yee, C., Lee, K.M.: Int. J. Mol. Sci. 15, 927-943 (2014)
- (21) Candido, S., Rapisarda, V., Marconi, A., Malaponte, G., Bevelacqua, V., Gangemi, P., Scalisi, A., McCubrey, J.A., Maestro, R., Spandidos, D.A., Fenga, C., Libra, M.: Oncol. Rep. 31, 1079-1082 (2014)
- (22) Baeissa, H.M., Benstead-Hume, G., Richardson, C.J., Pearl, F.M.: Biochem. Soc. Trans. 44, 925-931 (2016)
- (23) Morris, L.G.T., Chan, T.A.: Cancer 121, 1357-1368 (2015)
- (24) Coffin, J.M., Fan, H.: Annu. Rev. Virol. 3, 29-51 (2016)
- (25) Vogt, P.K.: Nat. Rev. Cancer 12, 639-648 (2012)
- (26) Nagarajan, A., Malvi, P., Wajapeyee, N.: Trends Cancer 2, 365-377 (2016)
- (27) Deininger, P.: Ochsner J. 1, 206-209 (1999)
- (28) Park, S., Chung, S., Kim, K.M., Jung, K.C., Park, C., Hahm, E.R., Yang, C.H.: Biochim. Biophys. Acta. 1670, 217-228 (2004)
- (29) Knudson, A.G: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 820-823 (1971)
- (30) Chial, H.: Nature Education 1, 177 (2008)
- (31) Rao, R., Honavar, S.G.: Ind. J. Pediatr. 84, 937-944 (2017)
- (32) Mendoza, P.R., Grossniklaus, H.E.: Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 134, 503-516 (2015)
- (33) Zilfou, J.T., Lowe, S.W.: Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1, a001883 (2009)
- (34) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochia species*, EMEA Evaluation of Medicines for Human Use 23 (2000)
- (35) Sekerka, P.: Živa 6, 254-256 (2007)
- (36) Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: Mutagenesis 17, 265-277 (2002)

- (37) Stiborova, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 23, 617-625 (2002)
- (38) Wanke, S., González, F., Neinhuis, C.: *Int. J. Pl. Sci. (Chicago, IL, U. S.)* 167, 1215-1227 (2006)
- (39) Gonzáles, F., Rudall, P.J.: *Plant Syst. Evol.* 241, 223-244 (2003)
- (40) Neinhuis, C., Wanke, S., Hilu, K.W., Müller, K., Borsch, T.: *Plant Syst. Evol.* 250, 7-26 (2005)
- (41) Ohi-Toma, T., Sugawara, T., Murata, H., Wanke, S., Neinhuis, C., Murata, J.: *Syst. Bot.* 31, 481-492 (2006)
- (42) Wagner, S.T., Isnard, S., Rowe, N.P., Samain, M.S., Neinhuis, C., Wanke, S.: *Am. J. Bot.* 99, 1609-29 (2012)
- (43) González, F., Wagner, S.T., Salomo, K., Symmank, L., Samain, M.S., Isnard, S., Rowe, N.P., Neinhuis, C., Wanke, S.: *J. Biogeogr.* 41, 380-391 (2014)
- (44) Pfeifer, H.W.: *Ann. Mo. Bot. Gard.* 53, 115-196 (1966)
- (45) Gentry, A. H.: The distribution and evolution of climbing plants, v knize The biology of vines (Putz, F.E., Mooney, H.A.) Cambridge University Press, Cambridge, 3-49 (1991)
- (46) International Agency for Research on Cancer, *Aristolochia species and aristolochic acids*, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82, 69-128 (2002)
- (47) Klitzke, C.F., Brown Jr, K.S.: *Chemoecology* 10, 99-102 (2000)
- (48) Mebs, D., Schneider, M.: *Chemoecology* 12, 11-13 (2002)
- (49) Kuo, P.C., Li, Y.C., Wu, T.S.: *J. Tradit. Complement. Med.* 2, 249-266 (2012)
- (50) Cosyns, J.P.: *Drug Saf.* 26, 33-48 (2003)
- (51) Chan, C.K., Liu, Y., Pavlovič, N.M., Chan, W.: *Toxics* 7, 14 (2019)
- (52) International Agency for Research on Cancer, *Plants Containing Aristolochic acid*, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 100, 347-359 (2012)
- (53) Anandagoda, N., Lord, G.M.: *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 167- 168 (2015)

- (54) Abdullah, R., Diaz, L.N., Wesseling, S., Rietjens, I.M.C.M.: Food Addit. Contam., Part A 34, 135-144 (2017)
- (55) Ng, A.W.T., Poon, S.L., Huang, M.N., Lim, J.Q., Boot, A., Yu, W., Suzuki, Y., Thangaraju, S., Ng, C.C.Y., Tan, P., Pang, S.T., Huang, M.Y., Yu, M.C., Lee, P.H., Hsieh, S.Y., Chang, A.Y., Teh, B.T., Rozen, S.G.: Sci. Transl. Med. 9, ean6446 (2017)
- (56) Zhang, H.M., Zhao, X.H., Sun, Z.H., Li, G.C., Liu, G.C., Sun, L.R., Hou, J.Q., Zhou, W.: J. Clin. Pharm. Ther. 44, 157-162 (2019)
- (57) Wang, D., Li, X.W., Wang, X., Tan, H.R., Jia, Y., Yang, Li., Li, X.M., Shang, M.Y., Xu, F., Yang, X.X., Shoyama, Y., Cai, S.Q.: Am. J. Chin. Med. 44, 291- 304 (2016)
- (58) Yuan, J., Luo, X., Guo, M., Wu, J., Yang, W., Yu, R., Yao, S.: Talanta 78, 1141-1147 (2009)
- (59) Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J., Simões, M.L., Lord, G.M., Nortier, J.L., Hollstein, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H: Carcinogenesis 28, 2253-2261 (2007)
- (60) Chan, W., Cui, L., Xu, G., Cai, Z.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 1755-1760 (2006)
- (61) Almazroo, O.A., Miah, M.K., Venkataramanan, R.: Clin. Liver Dis. 21, 1-20 (2017)
- (62) Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 154, 103-116 (2010)
- (63) Mix, D.B., Guinaudeau, H., Shamma, M.: J. Nat. Prod. 45, 657-666 (1982)
- (64) Krumbiegel, G., Hallensleben, J., Mennicke, W.H., Rittmann, N., Roth, H.J.: Xenobiotica 17, 981-991 (1987)
- (65) Chan, W., Luo, H.B., Zheng, Y., Cheng, Y.K., Cai, Z.: Drug Metab. Dispos. 35, 866-874 (2007)
- (66) Pfau, W., Schmeiser, H.H., Wiessler, M.: Carcinogenesis 11, 313-319 (1990)
- (67) Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Arlt, V.M.: Toxicol. Sci. 125, 345-358 (2012)
- (68) Rooney, P.H., Telfer, C., McFadyen, M.C., Melvin, W.T., Murray, G.I.: Curr. Cancer Drug Targets 4, 257-265 (2004)

- (69) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (70) Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Laňková, M., Kumstýřová, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 24, 1695-1703 (2003)
- (71) Arlt, V.M., Ferluga, D., Stiborova, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Vukelic, M., Ceovic, S., Schmeiser, H.H., Cosyns, J.P.: *Int. J. Cancer* 101, 500-502 (2002)
- (72) Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2144 (2017)
- (73) Dračinská, H., Bárta, F., Levová, K., Hudecová, A., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Kopka, K., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Toxicology* 344-346 (2016)
- (74) Jerabek, P., Martinek, V., Stiborova, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 33, 25-32 (2012)
- (75) Milichovský, J., Bárta, F., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V.: *Int. J. Mol. Sci.* 17, 213 (2016)
- (76) Stiborova, M., Martinek, V., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Curr. Drug Metab.* 14, 695-705 (2013)
- (77) Stiborová, M., Bárta, F., Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V.: *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27561-27575 (2015)
- (78) Maier, P., Schwalder, H., Weibel, B.: *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 275-284 (1987)
- (79) Schmeiser, H.H., Pool, B.L., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 7, 59 (1986)
- (80) Martínek, V., Bárta, F., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Monatshefte Chem.* 148, 1971-1981 (2017)
- (81) Stiborová, M.: osobní sdělení
- (82) Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breus, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H.: *Biotechnol. Adv.* 33, 1582-1614 (2015)
- (83) Buyel, J.F.: *Biotechnol. Adv.* 36, 506-520 (2018)
- (84) Yang, B., Xie, Y., Guo, M., Rosner, M.H., Yang, H., Ronco, C.: *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1605-1611 (2018)

- (85) Wang, L., Zhang, H., Li, C., Yi, Y., Liu, J., Zhao, Y., Tian, J., Zhang, Y., Wei, X., Gao, Y., Liang, A.: PLoS One 11, e0164215 (2016)
- (86) Poon, S.L., Huang, M.N., Choo, Y., McPherson, J.R., Yu, W., Heng, H.L., Gan, A., Myint, S.S., Siew, E.Y., Ler, L.D., Ng, L.G., Weng, W., Chuang, C., Yuen, J.S.P., Pang, S., Tan, P., Teh, B.T., Rozen, S.G.: Genome Med. 7, 38 (2015)
- (87) Trnacevic, S., Nislic, E., Trnacevic, E., Tulumovic, E.: Mater. Sociomed. 29, 207-210 (2017)
- (88) Đukanović, L., Radovanović, Z.: Balkan endemic nephropathy, v knize Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals (de Broe, M.E., Porter, G.A. ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston, str. 587-601 (2003)
- (89) Samardzic, J., Hasukic, S.: Med. Arch. 71, 430-433 (2017)
- (90) Grollman, A.P., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu, L., Moll, U., Suzuki, N., Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N., Turesky, R.J., Goodenough, A.K., Rieger, R., Vukelić, M., Jelaković, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 12129-12134 (2007)
- (91) Premužić, V., Ivković, V., Leko, N., Stipančić, Ž., Karanović, S., Jelaković, A., Vuković Brinar, I., Dika, Ž., Jelaković, B.: Front. Cardiovas. Med. 5, 166 (2018)
- (92) Đukanović, L., Radovanović, Z.: Balkan nephropathy, v knize Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals (de Broe, M.E., Porter, G.A. ed.) Springer, New York, str. 587-601 (2008)
- (93) Basic-Jukic, N., Hrsak-Puljic, I., Kes, P., Bubic-Filipi, L., Pasini, J., Hudolin, T., Kastelan, Z., Reiner, Z., Kordic, M., Brunetta, B., Juric, I.: Transplant. Proc. 39, 1432-1435 (2007)
- (94) Stefanovic, V., Toncheva, D., Polenakovic, M.: Clin. Nephrol. 83, 64-69 (2015)
- (95) Stefanovic, V., Polenakovic, M., Toncheva, D.: Pathol. Biol. 59, 286-291 (2011)
- (96) Tatu, C.A., Orem, W.H., Finkelman, R.B., Feder, G.L.: Environ. Health Perspect. 106, 689-700 (1998)

- (97) Chan, C.K., Liu, Y., Pavlović, N.M., Chan, W.: *Chem. Res. Toxicol.* 31, 1109-1110 (2018)
- (98) Radić, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucić, A.: *Toxicol. Lett.* 91, 105-109 (1997)
- (99) Krogh, P., Hald, B., Pleština, R., Čeović, S.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B Microbiol.* 85, 238-240 (1977)
- (100) Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A.: *Chem. Res. Toxicol.* 25, 252-262 (2012)
- (101) Mantle, P.G., Faucent-Marquis, V., Manderville, R.A., Squillaci, B., Pfohl-Leszkowicz, A.: *Chem. Res. Toxicol.* 23, 89-98 (2010)
- (102) Shao, I.H., Chang, Y.H., Pang, S.T.: *Int. J. Urol.* 26, 148-159 (2019)
- (103) Bui-Klimke, T., Wu, F.: *Risk Anal.* 34, 1688-1705 (2014)
- (104) Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M.: *Food Addit. Contam.* 19, 282-302 (2002)
- (105) Karmaus, W., Dimitrov, P., Simeonov, V., Tsoleva, S., Bonev, A., Georgieva, R.: *Environ. Health* 7, 11 (2008)
- (106) Feder, G.L., Radovanović, Z., Finkelman, R.B.: *Kidney Int. Suppl.* 34, 9-11 (1991)
- (107) Orem, W.H., Feder, G.L., Finkelman, R.B.: *Int. J. Coal Geol.* 40, 237-252 (1999)
- (108) Pavlović, N.M.: *Clin. Kidney J.* 6, 257-65 (2013)
- (109) Bunnell, J.E., Tatu, C.A., Lerch, H.E., Orem, W.H., Pavlovic, N.: *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 70, 2089-2091 (2007)
- (110) Voice, T.C., McElmurry, S.P., Long, D.T., Dimitrov, P., Ganev, V.S., Peptropoulos, E.A.: *J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol.* 16, 515-24 (2006)
- (111) Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Arch. Toxicol.* 90, 2595-2615 (2016)
- (112) Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M.S.: *J. Ethnopharmacol.* 125, 108-44 (2009)
- (113) Gruia, A.T., Oprean, C., Ivan, A., Cean, A., Cristea, M., Draghia, L., Damiescu, R., Pavlovic, N.M., Paunescu, V., Tatu, C.A.: *Environ. Geochem. Health* 40, 1437-1448 (2018)

- (114) Ivić, M.: Lijec. Vjesn. 91, 1278-1281 (1969)
- (115) Pavlović, N.M., Maksimović, V., Maksimović, J.D., Orem, W.H., Tatu, C.A., Lerch, H.E., Bunnell, J.E., Kostić, E.N., Szilagyi, D.N., Paunescu, V.: Environ. Geochem. Health 35, 215-226 (2013)
- (116) De Broe, M.E.: Kidney Int. 81, 513-515 (2012)
- (117) Chan, W., Pavlović, N.M., Li, W., Chan, C.K., Liu, J., Deng, K., Wang, Y., Milosavljević, B., Kostić, E.N.: J. Agric. Food Chem. 64, 5928-5934 (2016)
- (118) Jadot, I., Declèves, A.E., Nortier, J., Caron, N.: Int. J. Mol. Sci. 18, 297 (2017)
- (119) Depierreux, M., Van Damme, B., Vanden Houte, K., Vanherweghem, J.L.: Am. J. Kidney Dis. 24, 172-180 (1994)
- (120) Vanherweghem, J.L., Tielemans, C., Abramowicz, D., Depierreux, M., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., Dratwa, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Jadoul, M.: Lancet 341, 387-391 (1993)
- (121) Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P., Vanherweghem, J.L.: Lancet 343, 174 (1994)
- (122) Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T., Vanherweghem, J.L.: Nephrol. Ther. 11, 574-588 (2015)
- (123) Debelle, F.D., Vanherweghem, J.L., Nortier, J.L.: Kidney Int. 74, 158-169 (2008)
- (124) Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M., van Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J.P.: Cancer Research 56, 2025-2028 (1996)
- (125) Nortier, J.L., Martinez, M.C., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Bieler, C.A., Peterin, M., Depierreux, M.F., De Pauw, L., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P., Vanherweghem L.J.: N. Engl. J. Med. 342, 1686-1692 (2000)
- (126) Reginster, F., Jadoul, M., van Ypersele de Strihou, C.: Nephrol., Dial., Transplant. 12, 81-86 (1997)
- (127) Slade, N., Moll, U.M., Brdar, B., Zorić, A., Jelaković, B.: Mutat. Res. 663, 1-6 (2009)
- (128) Lord, G.M., Hollstein, M., Arlt, V.M., Roufosse, C., Pusey, C.D., Cook, T., Schmeiser, H.H.: Am. J. Kidney Dis. 43, e18.1-e18.7 (2004)

- (129) Colin, P., Seisen, T., Mathieu, R., Shariat, S.F., Rouprêt, M.: *Transl. Androl. Urol.* 5, 648-654 (2016)
- (130) Bárta, F.: Diplomová práce, PřF UK Praha, katedra biochemie (2012)
- (131) Hudecová, A.: Bakalářská práce, PřF UK Praha, katedra biochemie (2017)
- (132) Burda, P.: Diplomová práce, PřF UK Praha, katedra biochemie (2006)
- (133) Schmeiser H.H., Stiborova, M., Arlt, V.M.: *Methods Mol. Biol.* 1044, 389-401 (2013)
- (134) Martinek, V., Kubickova, B., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudecek, J., Stiborova, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 32, 57-70 (2011)
- (135) Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 113, 189-197 (2005)
- (136) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (137) Chan, W., Luo, H.B., Zheng, Y., Cheng, Y.K., Cai, Z.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 866-874 (2007)
- (138) Stiborová, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Arch. Toxicol.* 90, 2595-2615 (2016)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka